

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Generierung eines *Drosophila melanogaster*
Modellsystems für die lysosomale Speicherkrankheit
Morbus Fabry**

von Lotte Ruth Sabine Stauch

aus Frankfurt am Main

München, 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Am Klinikum der Universität Freiburg

Mentor: Prof. Dr. Tobias Huber

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	8
1.	Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.1.	Knockoutlinien.....	9
1.2.	Das Gal4/UAS System.....	10
1.3.	RNA-Interferenz	12
2.	<i>Drosophila</i> Nephrozyten als Modell für Podozyten	14
2.1.	Das exkretorische System des Menschen	14
2.2.	Das exkretorische System von <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.3.	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Systeme	18
3.	Morbus Fabry.....	20
3.1.	Definition und Prävalenz	20
3.2.	Pathogenese und Symptome	21
3.3.	Diagnose	23
3.4.	Therapie	24
3.5.	Fabry Nephropathie	24
4.	Bestehende Modellsysteme	26
5.	<i>Drosophila</i> als Modell für Morbus Fabry – Zielsetzung der Arbeit..	27
II.	MATERIAL UND METHODEN	28
1.	Material	28
1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterial	28
1.2.	Chemikalien.....	31
1.3.	Antikörper und Lektine	33
1.4.	Medien und Lösungen.....	34
1.5.	Fliegenstämme	35
1.6.	Software	37
1.7.	Online Tools.....	38
1.8.	Firmen	38
2.	Methoden.....	39
2.1.	Arbeiten mit <i>Drosophila</i>	39
2.2.	Präparation der Nephrozyten	42
2.3.	Histologische Methoden	49

2.4.	Überlebenskurve	53
2.5.	Enzymaktivitätstest	54
2.6.	Endogener Uptakeversuch	56
2.7.	Nachweis von Globotriaosylceramid	57
2.8.	RNAseq	58
III.	ERGEBNISSE	60
1.	Molekulare Analysen und Auswahl geeigneter <i>Drosophila</i> Stämme	60
1.1.	Bioinformatische Analysen.....	60
1.2.	Auswahl von stabilen <i>Drosophila</i> Linien	66
1.3.	Generierung einer kombinierten CG5731/CG7997 Knockdown Linie	67
2.	Enzymaktivitätstest.....	68
2.1.	Etablierung des Enzymaktivitätstests für <i>Drosophila</i>	68
2.2.	Knockout Linien	70
2.3.	RNAi Linien	72
3.	Transmissionselektronenmikroskopie	74
3.1	Knockout Linien	74
3.2.	RNAi – Linien	79
4.	Rasterelektronenmikroskopie	88
5.	CG7997 – Lokalisation	89
6.	Funktionelle Charakterisierung.....	91
6.1.	Überlebenskurve	91
6.2.	Nephrozytenfunktion: Endogener Uptakeversuch der RNAi-Linien...	92
6.3.	Nephrozytenfunktion: Silbernitrat Aufnahme von Garlandzellen der Knockoutlinien	96
6.4.	Nephrozytenfunktion: Gepulster ex-vivo Uptake von adulten Nephrozyten.....	98
7.	Biologische Charakterisierung	101
7.1.	Endozytose	101
7.2.	Autophagozytose	102
8.	Nachweis von Globotriaosylceramid.....	105
8.1.	Immunfluoreszenzfärbung	105
8.2.	Fluoreszenzmarkierte Lektine – Histochemische Färbung	106

8.3.	Dünnschichtchromatographie	110
9.	RNAseq	111
IV.	DISKUSSION	115
1.	Die <i>Drosophila</i> Sequenzhomologe der α -Galaktosidase A	115
2.	Der Enzymaktivitätstest als erste Charakterisierung	117
3.	Die Analyse der Ultrastruktur der <i>Drosophila</i> Nephrozyten mittels TEM.....	118
4.	Die Überlebenskurve der Knockoutlinien.....	122
5.	Die Untersuchungen zur Nephrozytenfunktion	123
6.	Die Untersuchung der endosomalen Kompartimente.....	125
7.	Die Untersuchung der Autophagozytosewege.....	127
8.	Die Suche nach Globotriaosylceramid	128
9.	Die Untersuchungen zum Fliegentranskriptom	130
V.	RETROSPEKTIVE VERBESSERUNGSMÖGLICHKEITEN DER ARBEIT .	131
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	132
VII.	SUMMARY	133
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	134
IX.	ANHANG	148
1.	Abkürzungsverzeichnis	148
2.	Tabellenverzeichnis.....	152
3.	Abbildungsverzeichnis.....	153
4.	Erklärungen zur Promotionsordnung (§ 4 Abs. 1 Nr. 2 - 4)	157
X.	DANKSAGUNG	158

I. EINLEITUNG

1. Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* ist schon seit den Versuchen von Thomas Morgan im Jahr 1910¹ Gegenstand der genetischen Forschung. Durch den übersichtlichen Chromosomensatz von nur 4 Chromosomen eignete sich *D. melanogaster* besonders für die damaligen Fragen der Vererbungslehre.

Doch auch noch heute ist *D. melanogaster* ein attraktives Modellsystem für verschiedenste Fragestellungen der Wissenschaft.^{2,3} Im Jahr 2000 wurde zum ersten Mal das komplette Genom von *D. melanogaster* sequenziert⁴ und eine erstaunliche Sequenzhomologie zum humanen Genom festgestellt. 62% der krankheitsrelevanten Gene des menschlichen Organismus haben ein Sequenzhomolog in *D. melanogaster*⁵. Oft ist die Konservierung der genetischen Sequenzen sogar so groß, dass ein murines Gen mit einem Drosophilahomolog in seiner Funktion ersetzt werden kann⁶.

Zusätzlich wurden seit dem Beginn der Forschung an *D. melanogaster* zahlreiche verschiedene genetische Werkzeuge und mutante Allele entwickelt, die den Erfolg der Taufliege als Versuchstier vorangetrieben haben. Durch die Entwicklung von Balancerchromosomen, welche die Rekombination verhindern, ist es heute möglich, rezessiv vererbte letale Mutationen über Generationen hinweg in einem Fliegenstamm zu erhalten. Eine weitere große Errungenschaft war die Entwicklung des UAS/Gal4 (*Upstream Activating Sequence – Gal4*) Systems⁷, welches die gezielte Expression von Transgenen in spezifischen Geweben ermöglicht. In dieser Arbeit wurde dieses System besonders in Kombination mit RNA-Interferenz genutzt, um die mRNA-Menge eines bestimmten Gens in spezifischen Geweben zu drosseln.

Die Haltung der Fliegen ist sehr einfach und kostengünstig, und die Versuche unterliegen nicht den für Tiermodelle mit Wirbeltieren geltenden Auflagen eines genehmigungspflichtigen Tierversuchs. Der Generationszyklus ist mit ungefähr 10 – 12 Tagen vergleichsweise kurz und die Fertilität mit ca. 1000 Eiern pro weiblicher Fliege sehr hoch. Außerdem ist eine enorme Anzahl transgener Fliegenstämme über verschiedene Stockcenter (Vienna Drosophila Research Center und Bloomington Drosophila Stock Center) kommerziell erhältlich, und mit der Internetseite Flybase.org wurde eine Plattform geschaffen, auf der alle

biologischen Informationen und erhältliche Linien nach Genen sortiert zusammengefasst sind.

Obwohl natürlich die großen Unterschiede zwischen Säugetier und Fliege nicht unberücksichtigt bleiben dürfen, bietet *D. melanogaster* besonders für die biologische Grundlagenforschung, aber auch für neue therapeutische Ansätze ein attraktives Modellsystem.

In dieser Arbeit wurden verschiedene genetische Werkzeuge zur Modifikation der Genexpression in *D. melanogaster* genutzt, die im Folgenden zum besseren Verständnis kurz erläutert werden sollen.

1.1. Knockoutlinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Knockoutlinien stammen aus dem Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC), einer Stammsammlung aus Indiana, die nahezu 59.000 verschiedene Fliegenlinien kommerziell vertreibt. Die verwendeten Knockoutlinien wurden vom BDSC mit einem nicht-viralen Genübertragungssystem, der sogenannten piggyBac Transposon Technologie (Abbildung 1), erstellt und werden ohne eine weitere Charakterisierung vertrieben.

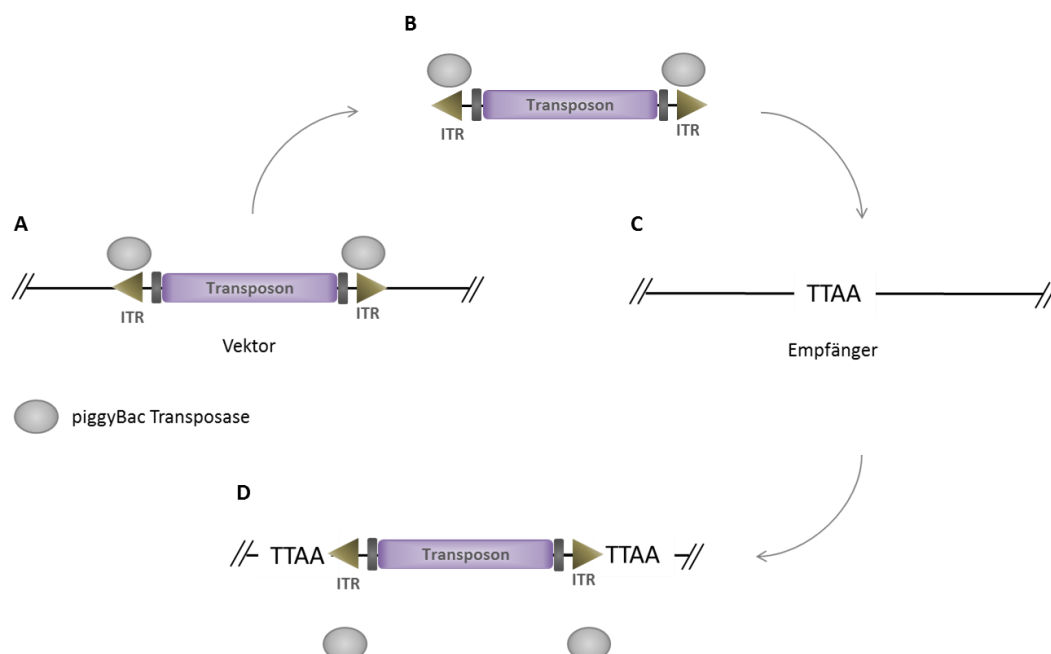


Abbildung 1 Transposoninsertion mit dem piggyBac Mechanismus.

(A) Vektor mit piggyBac Transposon. Transposase bindet an die inverted terminal repeat sequence (ITR) des Transposons (B) Transposasen schneiden das springende Gen aus dem Vektor heraus (C) Darstellung des Empfänger-genoms mit TTAA Sequenzen an Insertionsstelle (D) Insertion des Transposons in Empfänger-genom. Eigene Grafik.

Für die Mutagenese mit Transposons werden zwei Elemente benötigt (Abbildung 1 A). Auf der einen Seite das Transposonelement selbst, welches remobilisiert wird, an einer zufälligen Stelle im Empfänger genom eingefügt wird und dort für eine Deletion des unterbrochenen Gens sorgt. Auf der anderen Seite steht das sogenannte Helferelement, welches für das Enzym Transposase codiert, das für die Exzision und Insertion des Transposons sorgt⁸.

Wie alle Transposons enthält auch piggyBac invertierte repeat Sequenzen (inverted terminal repeat sequence, ITR) an beiden Enden, die für die Transposition unabdingbar sind. Außerdem ist das Transposonkonstrukt mit einem Markergen versehen, mit dem der Erfolg der Mutagenese phänotypisch erkannt werden kann. Die piggyBac Transposase wird in diesem Fall von außen zugegeben und nicht von dem Vektor selbst synthetisiert, sie bindet an die ITR Sequenzen und schneidet das Transposon aus dem Vektorgenom aus („cut-and-paste“ Mechanismus)⁹. Das Empfänger genom enthält TTAA Sequenzen, an denen die Insertion stattfindet. Die Transposase wird entfernt und so das Transposonkonstrukt im Empfänger genom verankert.

So wird an einem zufälligen, zunächst nicht bekannten Genort im Empfänger genom eine Mutation erzeugt, deren Folgen allerdings nicht vorausgesagt werden können. Der genaue Insertionslocus wird durch eine Genotypisierung im Nachhinein bestimmt, die Folgen dieser zufälligen Transposoninsertion müssen anschließend durch den Forscher selbst charakterisiert werden.

In dieser Arbeit werden diese Linien schon zu Beginn als „Knockoutlinien“ bezeichnet, um sie von den UAS-RNAi Linien abzugrenzen. Der funktionelle Knockoutnachweis erfolgte selbstverständlich im Verlauf der Arbeit.

1.2. Das Gal4/UAS System

Das Gal4/UAS System ist das „Schweizer Taschenmesser“ der *Drosophila* Forschung. Es wurde 1993 von Brand et al. für die zell- bzw. gewebespezifische Genexpression entwickelt⁷ und ist seitdem aus der Welt der *Drosophila* Forschung nicht mehr wegzudenken.

Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, besteht das System aus zwei Komponenten. Durch das Verkreuzen einer Treiberlinie mit einer Effektorlinie werden diese im Genom der entstehenden F₁-Generation vereint und führen dort zu einer zellspezifischen Genexpression.

Die Treiberlinie sorgt für die Zellspezifität des Systems. In ihr Genom wurde der Transkriptionsfaktor Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert, der unter der Kontrolle spezifischer regulatorischer Elemente steht. Diese treiben die Gal4-Expression in bestimmten Zellen oder Geweben an. Es gibt eine große Sammlung solcher Treiberlinien, die auch in verschiedenen Entwicklungsstadien nahezu jedes Gewebe abdecken¹⁰.

Die Effektorlinie enthält das Zielgen, welches unter der Kontrolle der sogenannten UAS (Upstream Activating Sequence) steht. Diese hat Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Gal4 und kann bei Bindung desselben die Expression des Zielgens aktivieren.

Kommen in der F₁-Generation beide Elemente zusammen, so wird in bestimmten Zellen der Fliege Gal4 exprimiert und kann dort an die UAS binden. So wird nur in diesen Zellen die Expression des downstream gelegenen Zielgens aktiviert. Da in den restlichen Zellen der Fliege kein Gal4 exprimiert wird, wird das Zielgen in dort auch nicht exprimiert.

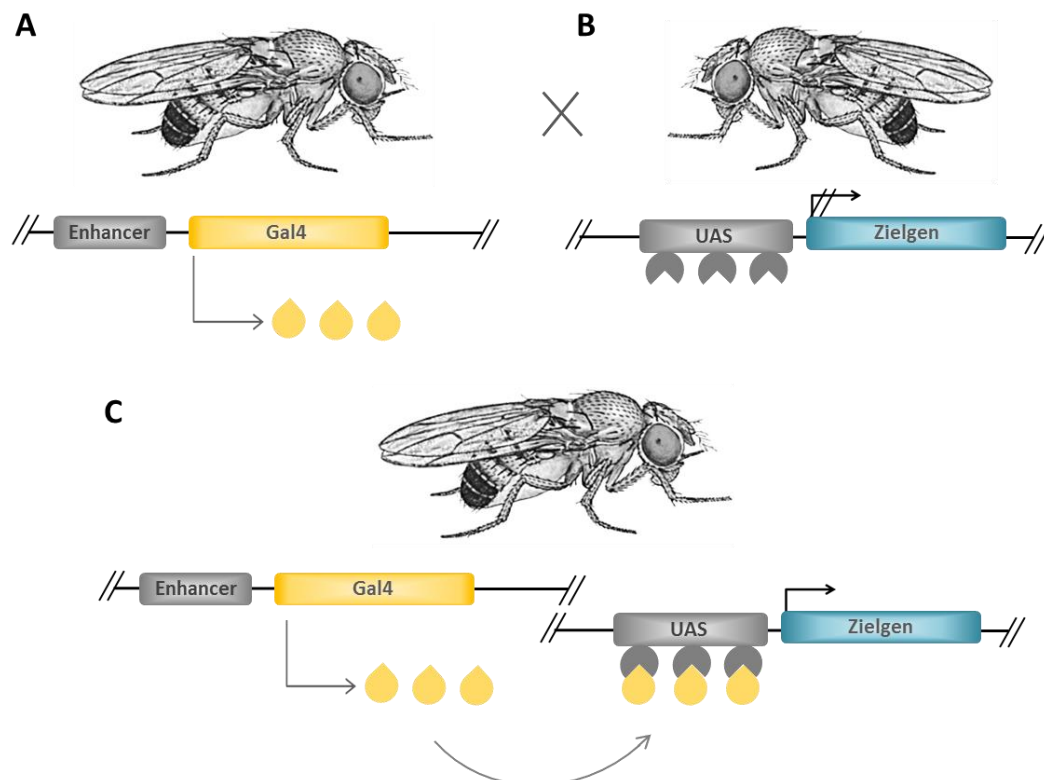


Abbildung 2 Schema des Gal4/UAS-Systems bei Drosophila.

(A) Treiberfliege mit gewebespezifischer Gal4 Expression (B) Effektorfliege mit dem UAS-Zielgen Konstrukt. Bindet kein Gal4 an die Upstream Activating Sequence, so wird das Zielgen nicht abgelesen (C) F₁-Generation der Kreuzung aus Treiber- und UAS-Transformante. Nur in spezifischen Geweben wird Gal4 exprimiert und kann an die UAS binden, das Zielgen wird aktiviert. Fliegenzeichnungen¹¹ mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press.

Für diese Arbeit wurde das Gal4/UAS-System in Kombination mit RNA-Interferenz genutzt, um in bestimmten Zellen die Menge an mRNA eines bestimmten Gens zu drosseln. So konnten die Auswirkungen des Knockdowns in diese Zelllinien isoliert ohne den Einfluss eines Knockdowns im restlichen Fliegenkörper studiert werden.

1.3. RNA-Interferenz

Mit Hilfe der RNA-Interferenz kann sequenzspezifisch die Transkription eines bestimmten Gens gehemmt und damit ein Knockdown dieses Gens erreicht werden. Sie wurde 1998 von Fire und Mello in *Caenorhabditis elegans* entdeckt und hat sich seitdem weltweit zu einem beliebten genetischen Werkzeug entwickelt¹². In *Drosophila* wurde das System zum ersten Mal im Jahr 2004 von Boutros et al. angewandt, um verschiedene *Drosophila*-Gene funktionell zu analysieren¹³.

In Zellen eingebrachte doppelsträngige RNA (dsRNA) wird durch das Enzym Dicer in kleinere Fragmente geschnitten, sogenannte kurze interferierende RNA Stränge (small interfering RNA, siRNA)¹⁴. Diese siRNA wird in Einzelstränge geteilt und der antisense Strang bindet daraufhin an den RNA induced silencing complex (RISC). RISC nutzt die siRNA als Schablone, bindet an die endogene, komplementäre mRNA und initiiert dort eine Spaltung¹⁵.

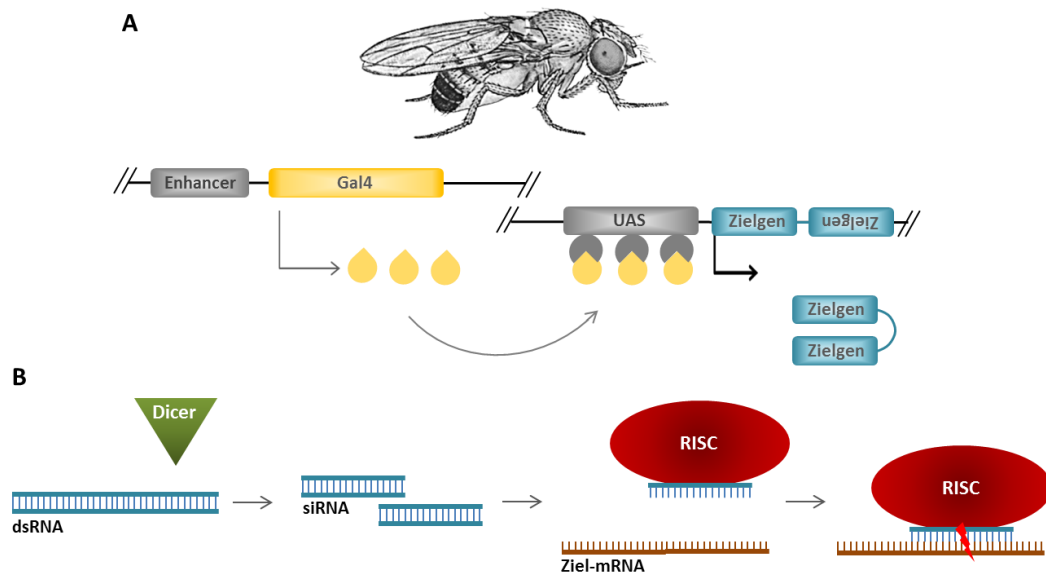


Abbildung 3 Schema der Funktionsweise der RNA Interferenz in Drosophila in Verbindung mit dem Gal4/UAS-System.

(A) Das Zielgen des Gal4/UAS-Systems ist so konstruiert, dass bei der Transkription eine doppelsträngige hairpin RNA entsteht. (B) Diese wird durch das Enzym Dicer in siRNA gespalten. Ein Strang der siRNA wird in den RISC als Schablone eingebaut, und so die endogene, komplementäre mRNA zerstört. Fliegenzeichnung siehe Abbildung 2, Rest eigene Abbildung.

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der RNA Interferenz in Kombination mit dem Gal4/UAS-System genutzt (Abbildung 3)¹³. Das Zielgen der UAS-Effektorlinie kodierte hier für die dsRNA. So musste diese nicht von außen zugegeben werden, sondern wurde in den Zellen, die Gal4 exprimierten, kontinuierlich synthetisiert und sorgte dort für einen Knockdown des Zielgens.

Die verwendeten UAS-RNAi-Linien stammen aus dem Vienna Drosophila Research Center (VDRC).

2. *Drosophila* Nephrozyten als Modell für Podozyten

Seit 2013 wird dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* auch in der nephrologischen Forschung immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt.¹⁶ Entdeckt wurden die Nephrozyten als Teil des exkretorischen Systems schon um 1900^{17,18}, aber erst im Jahr 2009 wurde das renale System von *Drosophila* in seiner Gesamtheit charakterisiert und die Ähnlichkeit zum System von Wirbeltieren festgestellt¹⁹. Kurze Zeit später folgte der Vorschlag, aufgrund der morphologischen Ähnlichkeiten und des vermuteten gleichen evolutionsbiologischen Ursprungs, *Drosophila* Nephrozyten als Modell für Podozyten zu nutzen²⁰.

2.1. Das exkretorische System des Menschen

Das exkretorische System des Menschen besteht aus den paarig angelegten Nieren, den Harnleitern, der Harnblase und der Harnröhre²¹. Die Osmoregulation und Filtration des Blutes findet in den Nieren statt, genauer in deren funktionellen Untereinheiten, den Nephronen²². Ein Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen (Glomerulus) und dem sich anschließenden Nierentubulussystem, welches in die Sammelrohre und anschließend ins Nierenbecken mündet²³.

Obwohl die Nieren mit nur ca. 1% des Körpergewichts ein verhältnismäßig kleines Organ sind, werden sie erstaunlich gut durchblutet: etwa 20 – 25% des Herzausstoßes gelangen zur Niere. Dadurch werden in den Glomeruli des Menschen etwa 120 Liter Primärharn pro Tag gebildet.

Diese Ultrafiltration wird von den Glomeruli geleistet, einer hochspezialisierten Untereinheit, die aus verschiedenen Zellarten aufgebaut ist (Abbildung 4). Am Gefäßpol tritt das zuführende arterielle Gefäß (Arteriola afferens) in das Nierenkörperchen ein. Dort verzweigt es sich in ein miteinander kommunizierendes Knäuel aus Kapillarschlingen, die sich anschließend wieder zum ableitenden Gefäß (Arteriola efferens) vereinen. Dadurch wird eine Vergrößerung der Oberfläche des Gefäßendothels erlangt und somit eine effektivere Filtration gewährleistet. Das interstitielle Gewebe der Niere wird Mesangium genannt²⁴.

Das Kapillarnetz ist von der sogenannten Bowmannschen Kapsel umgeben. Sie besteht aus zwei Blättern, einem inneren, viszeralen Blatt und einem äußeren, parietalen Blatt. Das parietale Blatt besteht aus einschichtigem Plattenepithel, das

viszerale Blatt wird von den Podozyten gebildet und liegt dem Gefäßendothel und seiner Basalmembran auf. Zwischen den beiden Blättern befindet sich der Kapselraum, in den der Primärharn filtriert wird. Dieser geht am Harnpol in den Nierentubulus über²⁴.

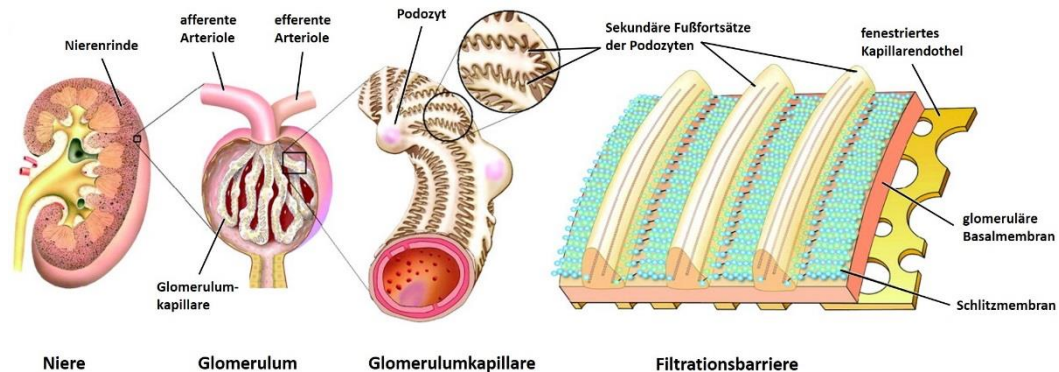


Abbildung 4 Schematischer Aufbau des renalen Filtrationssystems des Menschen.

(modifiziert nach Tryggvason und Wartiovaara, 2005²⁵, verwendet mit Erlaubnis der American Physiological Society) Die menschliche Niere enthält ca. 1 Million Glomeruli. Die afferente Arteriole verzweigt sich in ein Kapillarsystem, an deren Wänden sich das Filtrationssystem befindet. Die Filtrationsbarriere ist aus dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und letztendlich der Schlitzmembran zwischen den sekundären Fußfortsätzen der Podozyten zusammengesetzt. Das entstandene Ultrafiltrat (Primärharn) fließt in das Lumen der Bowmannschen Kapsel und wird von dort zum sich anschließenden Tubulussystem geleitet.

Der glomeruläre Filter ist also aus drei Bestandteilen aufgebaut: dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und den Filtrationsschlitten zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten (Abbildung 4). Zuerst wird das Blutplasma durch die ca. 60–70 nm breiten Öffnungen zwischen den Endothelzellen der Kapillaren gedrückt. Da die Endothelzellen auf der luminalen Seite von einer negativ geladenen Glykokalyx überzogen sind, findet neben der Größenselektion der Blutbestandteile auch eine ladungsselektive Retention statt.^{26,27,28} Hat das Filtrat diese erste Barriere überwunden, so gelangt es an die Basalmembran. Diese entsteht aus der Verschmelzung der Basalmembranen der Endothelzellen und der Podozyten, und besteht aus verzweigten Typ IV Kollagenfasern, in die verschiedene Proteoglykane eingebettet sind²⁹. Dadurch erhält auch die Basalmembran eine negative Ladung und wird daher oft als der Hauptbestandteil der ladungsselektiven Filtration bezeichnet³⁰. Die letzte Stufe der Filtrationsbarriere ist die Schlitzmembran, die zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten gespannt ist. Sie gilt als die zentrale Funktionseinheit der glomerulären Filtration.

Podozyten sind hochspezialisierte Zellen, die aus einem Zellkörper bestehen, der

primäre und sekundäre Zellfortsätze aussendet. Diese sogenannten Fußfortsätze stehen mit der glomerulären Basalmembran in Kontakt und sind ineinander verzahnt. Zwischen ihnen besteht ein spezialisierter Zell-Zell-Kontakt, die Schlitzmembran, als letzter Bestandteil des glomerulären Filters. Die Schlitz dieser Membran haben eine Größe von ca. 30–40 nm und sind damit der am stärksten größenselektive Bestandteil des Filters^{31,32}. Schon 1974 wurde postuliert, dass die Schlitzmembran einen Reißverschlussartigen Aufbau mit immer gleich großen Öffnungen (4×14 nm) besitzt, welche klein genug sind, um die Filtration von Albumin zu verhindern³³. Die Proteine, welche an der Bildung der Filtrationsbarriere beteiligt sind, wurden teilweise erst in den letzten Jahren identifiziert, hauptsächlich im Zusammenhang mit verschiedenen Nephropathien. Zu ihnen gehören Nephrin^{34,35,36}, Podocin³⁷, ZO-1³⁸, CD2AP^{39,40}, FAT1⁴¹, NEPH1⁴² und P-Cadherin⁴³.

2.2. Das exkretorische System von *Drosophila melanogaster*

Das exkretorische System der Fliege besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten, den Nephrozyten und den Malpighischen Schläuchen⁴⁴ (Abbildung 5). Die Nephrozyten dienen der Filtration von Giftstoffen aus der Hämolymphe, mit den Malpighischen Schläuchen können Bestandteile der Hämolymphe ausgeschieden werden^{19,20} (Abbildung 5).

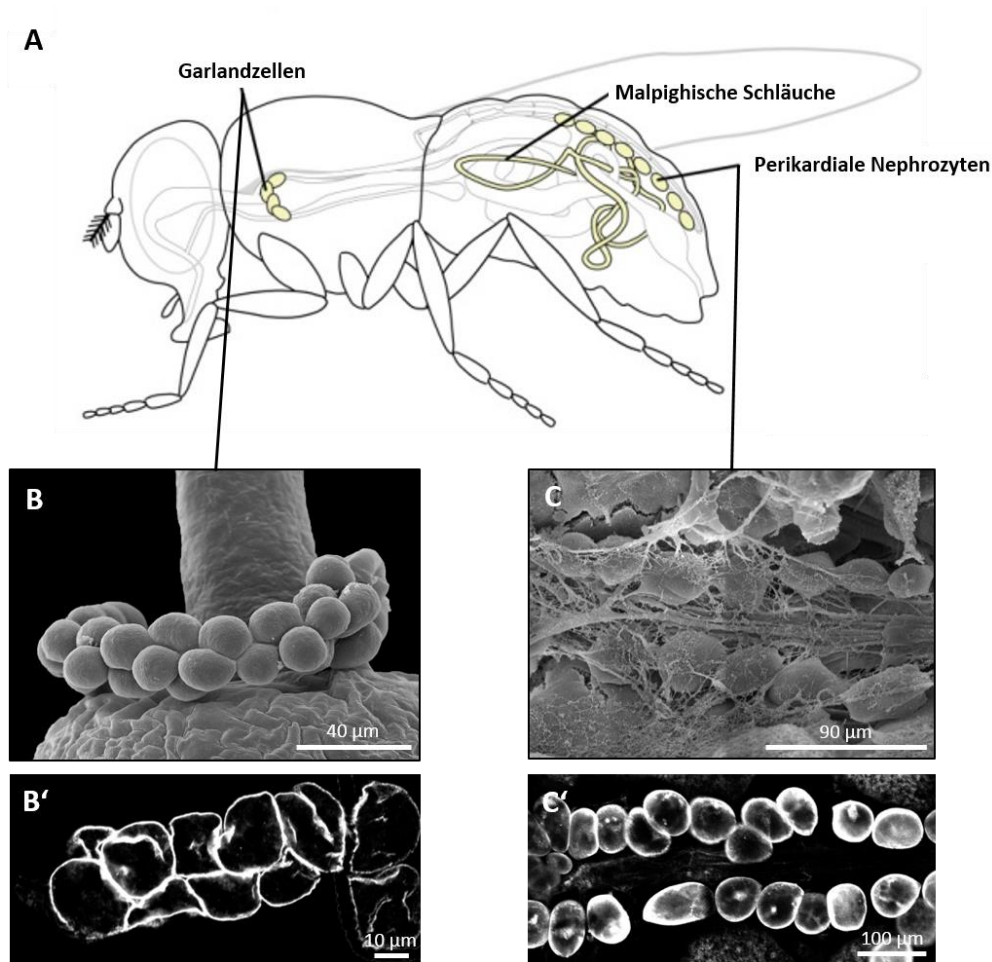


Abbildung 5 Schema des renalen Systems von *Drosophila melanogaster*.

(A) Schema der Nephrozytenpopulationen und malpighischen Schläuche einer adulten Fliege (Bild mit freundlicher Genehmigung von <https://drosophila4schools.wordpress.com>) (B) SEM-Bild von Garlandzellen aus dem 3. Larvenstadium (WTB) (Bild mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Helmstädter) (B') Konfokalmikroskopisches Bild von Garlandzellen aus dem 3. Larvenstadium (WTB), Anti-Sns: 488 nm (C) SEM-Bild von perikardialen Nephrozyten einer adulten Fliege (WTB, d28) (C') Konfokalmikroskopisches Bild von perikardialen Nephrozyten einer adulten Fliege (WTB, d28), Anti-Sns: 488 nm (B'-C': eigene Bilder)

Nephrozyten können durch Endozytose und anschließende Modifikation Giftstoffe aus der Hämolymphe aufnehmen und diese intrazellulär speichern („Speicherniere“)⁴⁵. Es gibt zwei Populationen von Nephrozyten, die sich in erster Linie durch ihre Lage im Organismus unterscheiden. Die Garlandzellen bilden einen girlandenförmigen Ring um den Oesophagus, während die perikardialen Nephrozyten sich perlenschnurartig aneinandergereiht beidseits des Herzschlauchs befinden (Abbildung 5).

Die Filtration bedarf im Gegensatz zur menschlichen Niere keines Druckgradienten und es wird vermutet, dass die Lage in der Nähe von kontraktile Organen (Herz, Ösophagus) der besseren Umspülung der Nephrozyten mit Hämolymphe dient⁴⁶. Die Malpighischen Schläuche münden in den Mitteldarm und dienen der Exkretion

von Stoffen wie Phosphat oder Harnsäure¹⁹.

2.3. Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Systeme

Die Nephrozyten von *Drosophila melanogaster* wurden in der Vergangenheit hauptsächlich für Fragestellungen zu Endozytoseprozessen als Modellsystem genutzt⁴⁷. Erst seit 2008 ist man sich der strukturellen und biochemischen Gemeinsamkeiten dieser Zellen mit der menschlichen Niere bewusst²⁰.

Im Säuger bilden Filtrationseinheit (Glomerulus), Modifikationseinheit (Tubulussystem) und harnableitende Wege ein geschlossenes System. In *Drosophila* hingegen besteht dieses System aus zwei Komponenten, die räumlich voneinander getrennt sind^{19,20} (Abbildung 6).

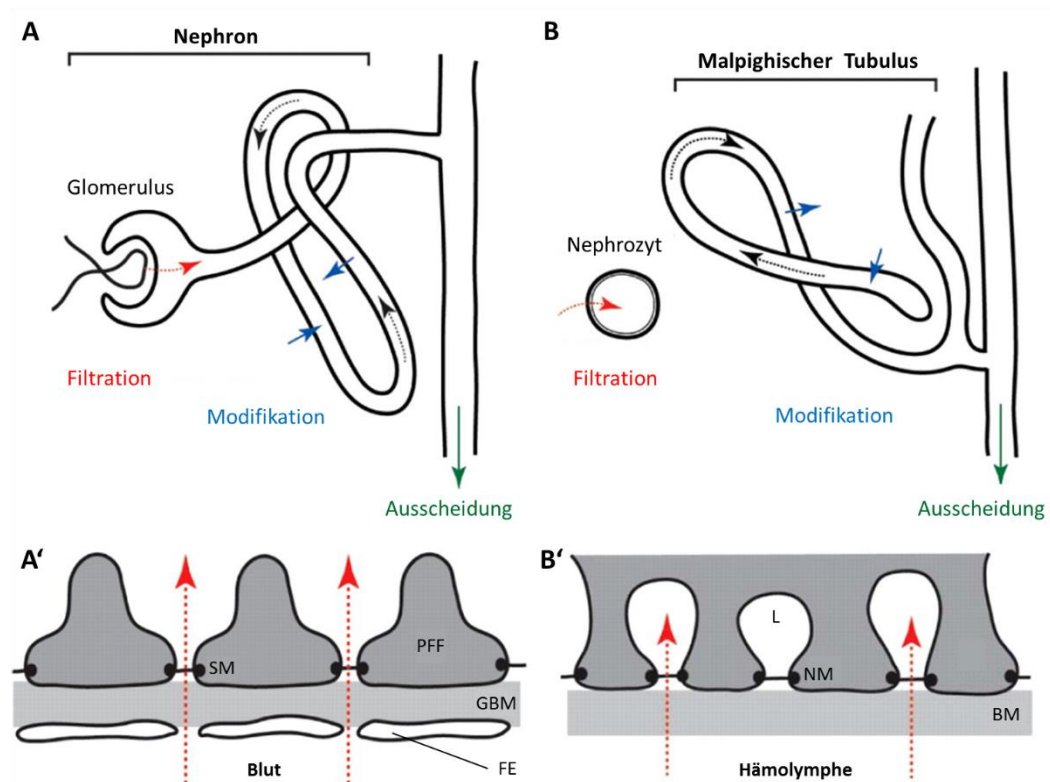


Abbildung 6 Exkretorisches System von Säuger (A und A') und Fliege (B und B').

(A) Funktionelle Einheit der Säugerniere (Nephron). Filtration, Modifikation und Ausscheidung finden in einem zusammenhängenden System statt. (B) Exkretorisches System von *Drosophila*. Filtration (und Speicherung) finden im Nephrozyten statt, Modifikation der Hämolymphe und Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen übernimmt der Malpighische Tubulus. (A') Filtrationseinheit der Säugerniere mit fenestriertem Endothel (FE), glomerulärer Basalmembran (GBM) und Schlitzmembran (SM) der Podozyten-Fußfortsätze (PFF). (B') Im Vergleich dazu die Filtrationseinheit von *Drosophila*: negativ geladene Basalmembran (BM), Nephrozytenmembran (NM) und Lakunen (L). Grafik mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach Weavers et al. 2009.

Die Oberfläche der Nephrozyten ist durch Einziehungen der Plasmamembran charakterisiert, über die Stoffe endozytiert werden können⁴⁸. Diese sogenannten „Lakunen“ werden von einer Membran aus Transmembranproteinen überspannt, die in ihrem Aufbau der Schlitzmembran der Säugerniere ähnelt. Auch die Größe der Filtrationsschlitz ist mit 30 nm ähnlich breit wie die der Filtrationsuntereinheit der Säuger. Anders als im Säuger ist in *Drosophila* die Schlitzmembran jedoch nicht zwischen zwei benachbarten Nephrozyten aufgespannt, sondern befindet sich innerhalb einer Zelle.

Die beiden Hauptkomponenten der Nephrozytenmembran sind zwei Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, Sticks and Stones (SnS) und Kin of Irre (Kirre), welche Homologe der Hauptkomponenten der Säugerschlitzmembran Nephrin und Neph1 sind. Nephrozyten sowie Podozyten sind die einzigen bekannten Zelltypen, in denen Sns bzw. Nephrin und Kirre bzw. Neph1 co-exprimiert sind⁴⁹. Transgene Herabregulation von Sns oder Kirre resultiert in einer verminderten Anzahl von Nephrozytenmembranen und einer Glättung der Oberfläche von Garland-Zellen⁵⁰.

Umgeben wird der Nephrozyt mit seinen Einstülpungen von einer negativ geladenen Basalmembran, welche somit die erste Barriere der Filtrationseinheit des Nephrozyten darstellt (Abbildung 6 B'). Wie im Säuger erfolgt die Filtration größen- und ladungsselektiv. Ausscheidungspflichtige Metabolite der Hämolymphe müssen zuerst die Basalmembran überwinden, anschließend die Nephrozytenmembran, um dann in den Lakunen endozytiert zu werden.

Auf Grund dieser überraschenden funktionellen und morphologischen Ähnlichkeiten der beiden Filtrationssysteme wurden die *Drosophila* Nephrozyten in einer Publikation von Simons und Huber et al. als "fliegende Podozyten" bezeichnet⁵¹. *Drosophila melanogaster* hat sich durch den Aufbau seiner Nephrozytenmembran, zusammen mit seinen immensen Vorteilen als Modellorganismus allgemein, als vielversprechendes Modellsystem für nephrologische Fragestellungen hervorgetan.

3. Morbus Fabry

3.1. Definition und Prävalenz

Morbus Fabry (OMIM 301500) ist eine X-chromosomal vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die durch einen Defekt des Enzyms α -Galaktosidase A (EC 3.2.1.22) ausgelöst wird.

Die humane α -Galaktosidase A (α GAL) ist ein Homodimer und katalysiert die Abspaltung von terminalen α -D-Galactosylresten von Glykolipiden⁵². Ein Defekt dieses Enzyms führt zu einer progressiven, systemischen Akkumulation von neutralen Glykosphingolipiden (GSL), insbesondere von Globotriaosylceramid (Gb3)⁵³. Durch progressive (besonders endotheliale) intrazelluläre Ablagerung dieser GSL kommt es unter anderem durch Ischämie und Infarktereignisse zu den klinischen Hauptmanifestationen der Erkrankung in Herz, Niere und ZNS.

Die Krankheit wurde zum ersten Mal im Jahr 1898 gleichzeitig und unabhängig voneinander von den beiden Dermatologen William Andersson⁵⁴ und Johannes Fabry⁵⁵ als Angiokeratoma corporis diffusum beschrieben. Erst später im Jahr 1939 wurde erkannt, dass es sich nicht um ein allein dermatologisches Problem handelt, sondern um eine multisystemische Erkrankung.⁵⁶

Die Prävalenz wird weltweit von 1/40000⁵⁷ auf bis zu 1/117000⁵⁸ der Neugeborenen geschätzt, eine Zahl, die vermutlich auf Grund der auch möglichen später einsetzenden Manifestation von Morbus Fabry insgesamt zu gering ausfällt. Andere Neugeborenenenscreening Untersuchungen aus Italien und China sprechen beispielsweise von einer Prävalenz von 1/3100⁵⁹ bzw. 1/1600⁶⁰. Damit ist Morbus Fabry die zweithäufigste lysosomale Speicherkrankheit nach Morbus Gaucher.

In der Veterinärmedizin ist bisher bei keiner Tierart ein Fall von Morbus Fabry bekannt. Zahlreiche andere lysosomale Speicherkrankheiten sind jedoch beschrieben und werden teilweise sogar als Modellsysteme für die humane Erkrankungsform genutzt⁶¹. Besonders reinrassige Hunde und Katzen scheinen von diesen genetischen Defekten betroffen zu sein. Beispielsweise gibt es Berichte von Morbus Pompe bei Katzen⁶² und Hunden, insbesondere dem Finnischen Lapphund⁶³, oder von Mukopolysaccharidosen (Typ I⁶⁴, II⁶⁵, III⁶⁶, VI⁶¹ und VII⁶⁷) in verschiedenen Hunde- und Katzenrassen. Generell glauben Experten, dass lysosomale Speicherkrankheiten auf Grund von mangelnder Kenntnis in diesem Fachbereich sowie fehlender Diagnosemöglichkeiten in der Veterinärmedizin unterdiagnostiziert sind⁶⁸.

3.2. Pathogenese und Symptome

Durch die α GAL Defizienz bei Morbus Fabry kommt es zu einer systemischen intrazellulären Akkumulation neutraler Glykosphingolipide (GSL), insbesondere Globotriaosylceramid.^{2,69} Diese Akkumulation betrifft ein breites Spektrum an Zellen, unter anderem Podozyten und renale Tubulusepithelzellen, Neuronen, Kardiomyozyten und Epithelzellen. Besonders betroffen sind jedoch vaskuläre Endothelzellen, was zu einer progressiven systemischen Vaskulopathie führt^{53,70}.

Die Pathogenese von Morbus Fabry ist nicht genau bekannt. Bisher wurde vermutet, dass die Gewebeschäden hauptsächlich durch Akkumulation von GSLs im vaskulären Endothel, Anschwellen dieser Zellen und damit durch Einschränkung des Lumens einer Minderperfusion des Gewebes ausgelöst werden. Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch die Ablagerung in parenchymalen Zellen eine große Rolle in der Pathophysiologie von M. Fabry spielt⁷¹. Es konnte bereits ein eingeschränkter Energiemetabolismus durch gestörte Mitochondrienfunktion in Zellen in vitro und in vivo nachgewiesen werden^{72,73,74}. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass eine Veränderung der Zusammensetzung der inneren Mitochondrienmembran durch die abnormale Menge lipophiler Speicherprodukte eine mögliche Ursache für die mangelnde mitochondriale Energieproduktion sein könnte.

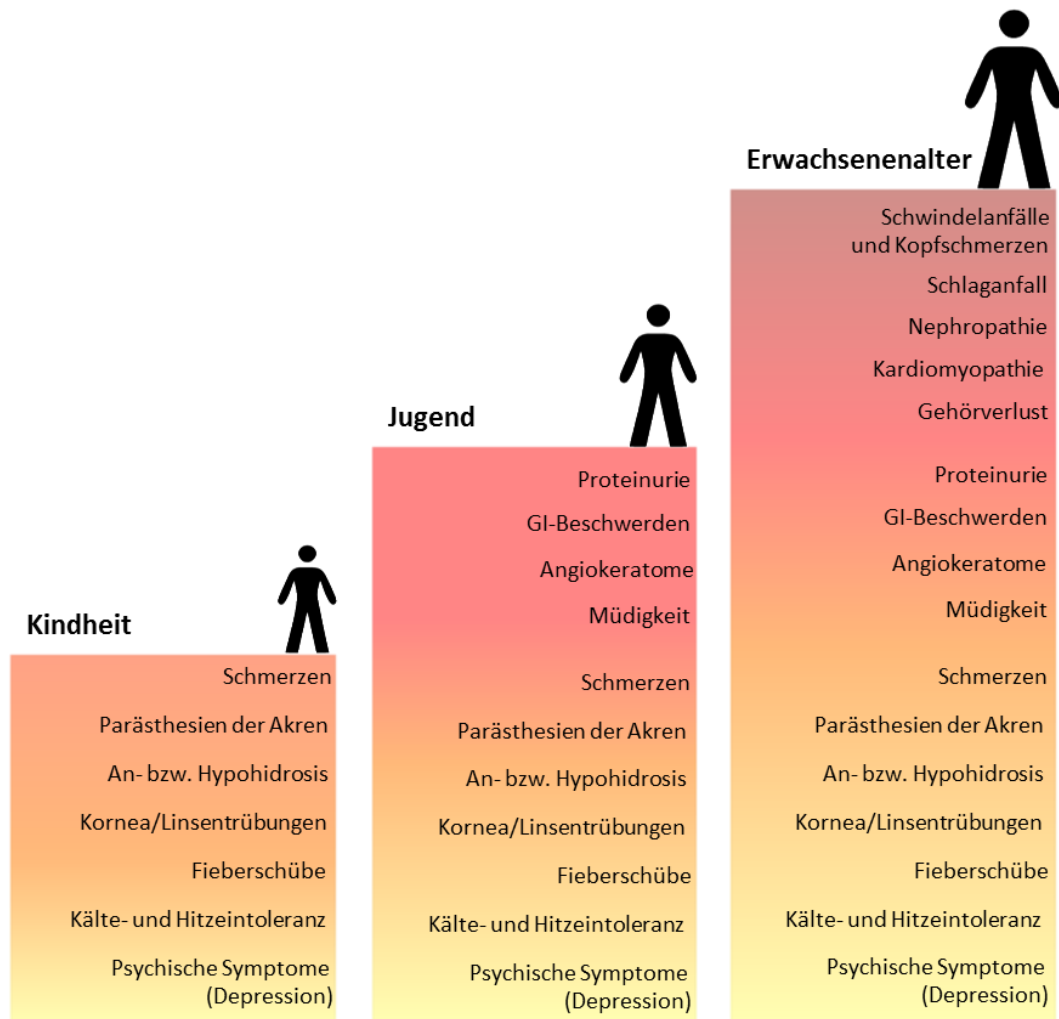


Abbildung 7 Symptome von Morbus Fabry, nach Altersgruppe geordnet aufgelistet.
Eigene Grafik.

Morbus Fabry kann verschiedene Manifestationen haben. Die klassische, sog. „early-onset“ Manifestation von Morbus Fabry betrifft männliche, hemizygoten Patienten ohne Restaktivität von α GAL, und beginnt im frühen Kindesalter.⁷⁵ Junge Patienten zeigen unspezifische Schmerzen und Parästhesien der Akren, gastrointestinale Probleme, Fieber unbekannter Ursache, Angiokeratome der Haut, Hypohidrosis und Trübungen der Kornea und Linse.^{75,76} Unbehandelt kommt es im weiteren Verlauf zu progressiver Niereninsuffizienz mit Proteinurie und glomerulärer Sklerose, kardialer Hypertrophie und Arrhythmien, Small Fibre Neuropathy sowie kardiovaskulären Störungen (zum Beispiel Schlaganfall) (Abbildung 7)^{77,78,79}.

Patienten mit einer Restaktivität von α GAL können erst später im Leben symptomatisch werden und zeigen meist nicht alle oben genannten Symptome. Es wird in der Literatur zwischen einer kardialen Variante^{80,81} und einer renalen

Variante⁸² unterschieden, darunter fallen Patienten, die hauptsächlich an Kardiomyopathie bzw. Nephropathie leiden. Der Übergang zwischen diesen beiden sogenannten „atypischen“ Verlaufsformen kann jedoch fließend sein. Gemeinsam ist ihnen das spätere Ausreten der Symptome und das Fehlen der typischen Symptome der „klassischen“ Verlaufsform (Angiokeratome, Akroparästhesien, Hypohidrosis und okuläre Veränderungen)^{81,83,59}.

Frauen wurden lange Zeit fälschlicherweise nur als asymptomatische Träger der Mutation angesehen, da man vermutete, dass sie durch das zweite, intakte X-Chromosom vor fehlender α GAL Aktivität geschützt sind. Heutzutage ist jedoch bekannt, dass auch Frauen eine große Bandbreite der Symptome von M. Fabry zeigen können, allerdings variieren die klinischen Ausprägungen stark. Manche betroffenen Frauen haben gar keine Beschwerden, andere zeigen die „klassische“ Manifestation von M. Fabry^{84,85}. Diese Heterogenität der Ausprägung geht vermutlich auf das Phänomen der Lyonisation zurück⁸⁶, einem Prozess, bei dem in jeder Körperzelle des weiblichen Embryos nach dem Zufallsprinzip eines der beiden X-Chromosome inaktiviert wird.⁸⁷ Heterozygot betroffene Frauen sind daher eine Art „Mosaik“ aus intakten und mutierten Zellen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen.

3.3. Diagnose

Auf Grund der Vielfältigkeit der Symptome dauert es im Durchschnitt zehn Jahre, bis bei einem betroffenen Patienten M. Fabry diagnostiziert wird⁸⁸. Eine möglichst frühe Diagnosestellung ist bei M. Fabry für den weiteren Krankheitsverlauf sehr wichtig. Ein frühes Einsetzen einer kausalen Therapie (Enzymersatztherapie oder Chaperontherapie) kann die Lebensqualität der Betroffenen erheblich verbessern und Endorganschäden reduzieren oder hinauszögern. Ein Enzymaktivitätstest zur Bestimmung der α GAL Aktivität aus peripheren weißen Blutkörperchen oder kultivierten Fibroblasten der Haut liefert erste Hinweise und ist bei männlichen Patienten das Mittel der Wahl⁵³. Bei weiblichen Patienten kann die Enzymaktivität in diesem Test normal sein⁸⁹, auch wenn die Patienten Symptome zeigen. In diesem Fall wird eine genetische Analyse durchgeführt, um die Mutation zu erkennen und die Diagnose zu stellen⁹⁰.

Alles in allem sollte eine Genotypisierung auch bei bereits mittels Enzymaktivitätstest diagnostizierten männlichen Patienten durchgeführt werden, um die verschiedenen genetischen Mutationen besser zu dokumentieren und zu charakterisieren.

3.4. Therapie

Lange Zeit war die Therapie von M. Fabry rein symptomatisch, obwohl schon in den frühen 70er Jahren erfolgreich erste Studien zu einer kausalen Therapie durchgeführt wurden^{91,92}. Erst seit 2001 ist in Europa die Enzyersatztherapie mit rekombinanter α GAL zugelassen, bei der Patienten lebenslang alle zwei Wochen eine intravenöse Behandlung erhalten. Die Ergebnisse sind vielversprechend, die Gb3 Ablagerungen konnten deutlich verringert werden und die Endorganschädigung begrenzt oder herausgezögert werden^{93,94,95}. Zugelassen sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit zwei Präparate: Agalsidase alfa (*Replagal*®, *Shire Human Genetic Therapies, Inc.*) aus humanen Fibroblasten, und Agalsidase beta (*Fabrazyme*®, *Genzyme Corporation*) aus Chinese Hamster Ovaries - Zellen. In klinischen Untersuchungen konnte bisher kein Unterschied beider Präparate in der Wirksamkeit am Patienten nachgewiesen werden⁹⁶.

Trotz der vielversprechenden Erfolge bedeutet die regelmäßige Infusionstherapie eine Einschränkung der Lebensqualität der Patienten. Darüber hinaus kommt es häufig zu Nebenwirkungen durch allergische Reaktionen (Hautrötung, Tachykardie, Erbrechen, Bauchschmerzen, Durchfall, Schwindel und Myalgie), auf Grund derer die Therapie in manchen Fällen abgebrochen werden muss.

Die Kosten für ein Jahr Enzyersatztherapie liegen bei ca. 250.000 Euro pro Patient und sind damit vergleichsweise teuer.

Eine weitere zugelassene Therapieoption ist die pharmakologische Chaperontherapie mit Migalastat. Kommt es durch die Mutation im GLA Gen zu einer Fehlfaltung der α GAL, kann das aktive Zentrum des Enzyms durch ein kleines, substratähnliches Molekül (sog. pharmakologischer Chaperon) stabilisiert werden^{97,98}. Diese Therapie ist allerdings nicht bei allen Mutationen erfolgreich, ob eine Mutation für die Behandlung mit Migalastat geeignet ist, sollte vorher mit einem GLP-validierten HEK-Test⁹⁹ evaluiert werden.

Eine komplette Heilung von M. Fabry ist bisher nicht möglich.

3.5. Fabry Nephropathie

Diese Arbeit wurde besonders im Hinblick auf nephrologische Fragestellungen erstellt, daher soll die Pathogenese der renalen Verlaufsform von M. Fabry genauer beleuchtet werden.

Die Nephropathie ist nicht nur in der renalen Verlaufsform noch immer eine der schwersten Komplikationen von M. Fabry. Vor der Einführung der

Enzymersatztherapie zeigte die Mehrheit der Patienten bereits vor dem 30. Lebensjahr eine terminale Niereninsuffizienz¹⁰⁰. Die genaue Pathogenese und die molekularen Mechanismen, die zur Schädigung des glomerulären Filters der Niere bei M. Fabry führen, sind jedoch noch größtenteils unbekannt.

Histopathologisch gesehen manifestiert sich die Fabry Nephropathie als fokal segmentale Glomerulosklerose. Lichtmikroskopische Untersuchungen von Nierenschnitten (Abbildung 8 A) zeigen hypertrophe Podozyten mit schaumig erscheinenden Vakuolen, das Mesangium erscheint vergrößert¹⁰¹. Im weiteren Verlauf der Erkrankung bildet sich eine Glomerulosklerose, die zuerst nur in manchen Glomeruli und auch dort nicht gleichmäßig das gesamte Glomerulum betreffend auftritt (fokal segmental), die sich aber später über die gesamte Niere ausbreitet.

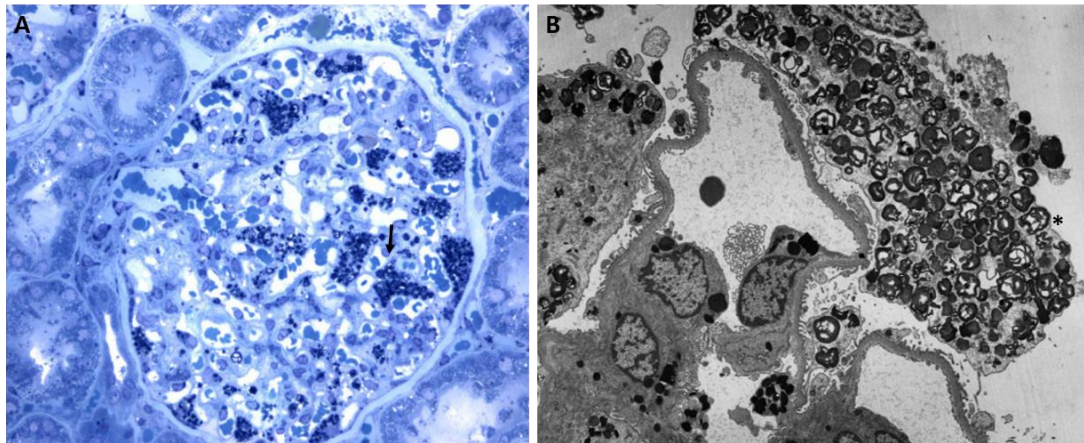


Abbildung 8 Histologische Veränderungen der Niere bei Fabry Nephropathie.

(A) Lichtmikroskopische Bilder eines Glomerulus mit Glycolipid-Einschlusskörperchen in den Podozyten („schaumiges“ Aussehen) (Pfeil). 320fache Vergrößerung. (B) Elektronenmikroskopische Bilder der Niere eines Fabry Patienten mit Akkumulation von Speichermaterial in den sekundären Lysosomen (Zebra bodies, (*)). 8200fache Vergrößerung. Bilder modifiziert nach Prof. Marie-Claire Gubler, Paris, France über Germain et al. ¹⁰² (BioMed central, „open access“ Quelle)

Elektronenmikroskopische Bilder (Abbildung 8 B) zeigen vergrößerte sekundäre Lysosomen, die mit lamellären, membranartigen Strukturen gefüllt sind („Myeloid“- oder „Zebra bodies“)¹⁰³. Die Podozyten zeigen oft eine Fußfortsatzverschmelzung, die in Zusammenhang mit der fortschreitenden Proteinurie der Patienten steht. Die glomeruläre Basalmembran ist häufig verdickt.

4. Bestehende Modellsysteme

Obwohl es verschiedene Ansätze für die Entwicklung eines geeigneten Modellsystems für M. Fabry gab, haben sich in der Forschung bisher langfristig nur *in vitro* Modelle durchgesetzt. Ohshima et al. gelang es 1997 zum ersten Mal, eine α GAL Knockout Maus zu generieren¹⁰⁴. Im Enzymaktivitätstest zeigte diese Maus eine komplett fehlende α GAL Aktivität und schon im Alter von 10 Wochen konnten die für M. Fabry typischen lamellären Einschlusskörperchen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Akkumulation von Gb3 wurde mit einem α -galaktosylbindendem Lektin aus *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* in Färbungen und einer HPTLC (Hochleistungs-dünnschichtchromatographie) nachgewiesen.

Trotz der elektronenmikroskopischen Veränderungen und der Akkumulation von Gb3 zeigten diese Mäuse keinerlei klinischen Phänotyp und keine histologisch nachweisbare, unspezifische pathologische Veränderung im Gewebe (wie zum Beispiel Glomerulosklerose oder interstitielle Fibrose). Ein Grund für die fehlende Auswirkung der Veränderungen auf die Gesundheit dieser Mäuse konnte bisher nicht identifiziert werden. Seit 1997 wurden Versuche unternommen, dieses Mausmodell zu verbessern¹⁰⁵, allerdings konnte sich bisher auch keines der neueren Modelle langfristig durchsetzen.

Außerdem wurde 2005 ein *Caenorhabditis elegans* Modell für Morbus Fabry entwickelt¹⁰⁶, welches allerdings nicht auf große Resonanz in der Fabry Forschung stieß.

Abgesehen von den mangelhaften *in vivo* Modellen fehlt besonders für nephrologische Fragestellungen ein geeignetes Modell für M. Fabry. Auch *in vitro* Modelle zeigen schwerwiegende Mängel, da Podozyten in Zellkultur keine Schlitzmembran ausbilden, welche die *in vivo* Situation ausreichend repräsentiert^{107,43}. So fehlt in diesem Bereich ein Modell für grundlegende Fragestellungen.

5. *Drosophila* als Modell für Morbus Fabry – Zielsetzung der Arbeit

Besonders vor diesem Hintergrund ist die Notwendigkeit für ein neues *in vivo* Modell für Morbus Fabry klar geworden. Die aufgezeigten Vorteile von *Drosophila melanogaster* als Versuchstier machen diesen Organismus zum idealen Modell für die nötige Grundlagenforschung auf dem Gebiet der lysosomalen Speicherkrankheiten. Durch die Ähnlichkeit der Nephrozyten mit Podozyten wird das Modell dabei besonders für die nephrologische Forschung interessant.

In dieser Arbeit soll ein solches *Drosophila* Modell durch den Knockout des Fliegenhomologs von α -Galaktosidase A geschaffen, charakterisiert und etabliert werden. Dabei sollen, unter anderem auch mittels zellspezifischem Knockdown, insbesondere die Auswirkungen auf die Nephrozyten und deren Funktion analysiert werden. Zur Charakterisierung des Modells soll dabei bevorzugt mit Methoden aus der humanmedizinischen Diagnostik gearbeitet werden, um die Übertragbarkeit des Modells zu demonstrieren.

Diese Arbeit soll als solide Basis für zukünftige Forschungsarbeiten zur Pathogenese von Morbus Fabry dienen, aber auch die Etablierung neuer Therapieansätze für diese zwar relativ seltene, aber ernste Erkrankung ermöglichen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Fliegenarbeit und Laborgeräte allgemein	
Bechergläser	Schott, Mainz, Deutschland
Binokular Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Erlenmayerkolben	Schott, Mainz, Deutschland
Flypad und CO ₂ - Pistole	Genesee Scientific, San Diego, USA
Gefrierschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Inkubator 19°C	Lucky Reptile, Import Export Peter Hoch GmbH, Waldkirch, Deutschland
Inkubator 29°C	Sanyo, Moriguchi, Japan
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Labor Rotator (roll shaker)	Phoenix instruments, RS-TR 05
Laborabzug ZBSA	Wesemann, Wangen im Allgäu, Deutschland
Laborflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
Magnetrührer	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Magnetrührplatte	Heidolph instruments, MR Hei-Tec
Mehrfachpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Multipipette M4
Mikrowelle	Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter	Knick international, pH-meter766 Calimatic
Pinsel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences, USA
Pipetten	Gilson, Middleton, U.S.A.
Precellys Minilys	Bertin Technologies
Schnorchel für Fliegenarbeit	selbst gebaut aus Pasteurpipette, Gummischlauch, Filter aus Ceaprenstopfen, Pipettenspitze
Stoppuhr	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vortexmischer	VWR, Deutschland, VV3
Wärmeschrank	Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5415R

Tabelle 1 Geräte für die Fliegenarbeit und Laborgeräte allgemein.

Präparierwerkzeug und Mikroskope, Zentrum für Biosystemanalyse	
Alu Rack	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Axioimager Z1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Italy, AF20
Konfokales Mikroskop	Eclipse Ti, Nikon, Tokio, Japan
Kühlkörper/Eisbank	Fischer Elektronik, Mittenwalde, Deutschland
Microplate Reader	BioTek, Synergy H4
Pinzetten	Nr. 5 und Nr. 7, Dumont, Montignez, Schweiz
Pipettierroboter	BioTek, EL406
Präparierschale aus Glas	Hecht Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Präparierscheren	23 mm und 5 mm Blades, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2 Präparierwerkzeug und Mikroskope, ZBSA.

Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie	
Aluminiumprobenteller	Werkstatt, Bio III, Universität Freiburg
Laborabzug anatomisches Institut	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop, 1450VP	LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, U.K.
Sputter Coater	Cressington, Watford, England
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop, CM100	Philips, Amsterdam, Niederlande
Wärmeschränk, anatomisches Institut	Memmert, Schwabach, Deutschland

Tabelle 3 Geräte für Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie.

Histochemische Färbungen mit Lektinen und Dünnschichtchromatographie	
2 ml Glasbehälter und Schraubdeckel (ohne Loch)	Rotilab® sample vials and lids, 2 ml, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chemilumineszenz und Fluoreszenz Detektor	Fusion FX, Vilber Lourmat
Kammer für Dünnschichtchromatografie	Type 2, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ofen	UFE 400, Memmert
Spritzen	750N (500 µl, g22S) 710N (100 µl, g22S) 702N (25 µl, g22S) 701N (10 µl, g26S), Hamilton
Sprühflasche	0499.1, Vitri
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific

Tabelle 4 Geräte für Lektinfärbung und DC, BIOSS.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
0,2 ml PCR-Softtubes	Biozym, Oldendorf, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15 ml Falcon-Gefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Falcon-Gefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Akupunkturnadeln	Dongbang, Korea
Alufolie	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alufolie	Rotilabo® 16 µm, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bleistift	Faber-Castell, Deutschland, 4 = 2H
Ceaprenstopfen für <i>Drosophila</i> Gefäß	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen 22 x 22 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläschen 24 x 50 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Drosophila</i> Gefäß 68ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Dünnschichtchromatografie-platte	HPTLC-r.-to-use layers Nano-SIL-20 UV254, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier Type 714	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Geometrie Dreieck	16 cm, Alco, Deutschland
Kanülen, Sterican	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Latexhandschuhe	Ansell, Richmond, Australien
Leit-Taps	Plano, Wetzlar, Deutschland
Nagellack, Essence the gel	Cosnova GmbH, Sulzbach, Deutschland
Nitrilhandschuhe powderfree	Ansell, Richmond, Australien

Objektträger 76 x 26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim, Deutschland
Petrischale 35 x 10mm mit Nocken	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Petrischale 94 x 16mm mit Nocken	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pflaster, braun	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Präzisionstücher, Kimtech Science	Kimberly-Clark Professional, Koblenz /Rheinhafen, Deutschland
Precellys Lysing Kit Soft tissue homogenizing CK14	Bertin Technologies
Rasierklingen	American safety razor, Verona, U.S.A.
Rollrandgläser	Bruno Kummer, Freiburg, Deutschland
Schwarze 96-Well Platten	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA U.S.A.
Silikonform zum Einbetten	Plano, Wetzlar, Deutschland
Skalpell	Surgical Disposable Scalpels, Braun, Deutschland
Spitzen für Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Combitips advanced 0,5 ml
Spritzen, Omnifix-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zahnstocher aus Holz	dm, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien.

1.2. Chemikalien

Chemikalien	Herkunft
1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4-MU- α -D-Galaktopyranosid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Anisaldehyd	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Backhefe, frisch	Fala GmbH, Bühl, Deutschland
Bierhefe	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CHCl ₃	ROTISOLV® $\geq 99.8\%$, UV/IR-Grade, Roth, Deutschland
Durcupan-Komponenten	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ethanol 99% vollst. Verg.	SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
FITC-Albumin, A9771	Sigma Aldrich, München, Deutschland

Gb3 Standard für DC	Matreya LLC
Glutardialdehyd 25 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Guanidiniumthiocyanat	Merck Millipore
HCL 6N	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Hefeextrakt	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Hefeflocken	Naturata AG, Murr, Deutschland
Hoechst	Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA
Laurylsarcosine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
LB-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Maisgrieß	Davert GmbH, Senden, Deutschland
Mannitol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	HiPerSol Chromanorm VWR
Methanol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Mitespray	Genesee Scientific, San Diego, USA
N-acetyl-D-Galaktosamin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
NaOH 6N	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Natriumphosphat dibasic	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Nipagin = Tegosept	Genesee Scientific, San Diego, USA
Osmiumtetroxid 4 % (aufgelöst in Aqua Bidest)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Anisaldehyd	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyde Powder 95%	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehydlösung 32%	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Penicillin-Streptomycin, 10000 units penicillin und 10 mg streptomycin pro ml	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Peptonwasser, gepuffert, granuliert	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyisobutylmethacrylat	Polyisobutylmethacrylate, Sigma, Deutschland
ProLong Gold Antifade Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Propionsäure	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Propylenoxid	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Silica Gel Orange	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sojamehl	SOBO Naturkost, Köln-Marsdorf, Deutschland
Streptavidin mit AP, 2 mg/ml	Thermo Scientific
Substratpuffer für DC	NBT/BCIP Substrate Solution, Thermofisher
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Uranyl Acetate Dihydrate Powder	Ted Pella, Redding, U.S.A.
Vaseline	Unilever, Hamburg, Deutschland
Vectashield	Vector Laboratories; Vertrieb Linaris, Wertheim, Deutschland
Zuckerrübensirup	Lichtenauer Sonnentau, Lichtenau, Deutschland

Tabelle 6 Chemikalien

1.3. Antikörper und Lektine

Alle Antikörper wurden in der angegebenen Konzentration in einer Lösung aus PBST und 10% Natriumazid (1:200) verwendet.

Primärantikörper	Tier	Konzentration	Herkunft
126i (Kirre)	Kaninchen	1:200	Labor Fischbach
CD77/Gb3	Ratte	1:200	Abcam, Cambridge, UK
GFP	Maus	1:200	Invitrogen, Karlsruhe
Sns Hen	Huhn	1:200	Labor Krahn
SNS M3, M5	Maus	1:200	Labor Fischbach

Tabelle 7 Primärantikörper.

Sekundärantikörper	Tier	Konzentration	Herkunft
Alexa Fluor® 488 anti-chicken	Ziege	1:1000	Invitrogen Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 / 568 / 647 anti-rabbit	Ziege	1:200	Invitrogen Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 / 568 / 647 anti-rat	Ziege	1:200	Invitrogen Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 / 568 / 647 anti-mouse	Ziege	1:200	Invitrogen Karlsruhe

Tabelle 8 Sekundärantikörper.

Fluoreszenzmarkierte Lektine	Konzentration	Herkunft
Shiga-like toxin 1 subunit B – Cy5	1:100 (mit PBS verdünnt)	Prof. Dr. Winfried Römer, Freiburg

Tabelle 9 Fluoreszenzmarkierte Lektine.

1.4. Medien und Lösungen

Beschreibung	Zusammensetzung
Anisaldehyd/Schwefelsäurelösung	35 µl <i>p</i> -Anisaldehyd mit 5 ml Säurealkohol (90% Methanol, 5% Essigsäure, 5% Schwefelsäure) mischen
Aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90% und 96%)	Die jeweilige Verdünnung mit destilliertem Wasser und Ethanol (99% vollst. Verg.) ansetzen
Blockierlösung für DC	5% BSA in PBS
Bouin Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Detektionspuffer für DC	1.8 µg bStxB in 1 ml Blockierlösung auflösen
<i>Drosophila</i> Futtermedium	88g Agarose in 7L kochendes Leitungswasser einrühren; 2-3 min aufkochen; 686g Hefeflocken, 560g Maisgrieß und 756g Sojamehl einrühren; 15 min kochen lassen; 280g Zuckerrübensirup und 560g Gerstenmalzextrakt einrühren; 30mL Propionsäure und 7g Nipagin in 70mL Ethanol zugeben; In <i>Drosophila</i> -Gläser überführen; nach Erkalten mit Ceaprenstopfen verschließen
FITC-Albumin Lösung	0,2 mg/ml PBS
Fixierlösung für DC	15 g Polyisobutylmethacrylat zu 400 ml n-Hexan hinzufügen und für 45 min bei 60°C auflösen lassen. Den Überstand abnehmen und als Fixierlösung verwenden.
Futtermedium mit Silbernitrat	Reguläres Futtermedium mit 0,0005% Silbernitrat versetzen, gut verrühren
GTC-Lysepuffer Stock	94,4g Guanidiniumthiocyanat 1g N-Laurylsarcosin eventuell erwärmen in 80ml H ₂ O 5ml Na-citrat (1M) 100µl NaOH (1N) etwa pH=7 checken steril filtrieren 0,8µM 7µl Mercaptoethanol/ml GTC (4Wochen haltbar)
Lysepuffer für Enzymaktivitätstest	27 mmol/l Natriumcitrat 46 mmol/l Natriumphosphat dibasic 0,1% Triton X-100 In ddH ₂ O auflösen pH = 4,6 (mit 6N HCl einstellen)
Mobile Phase DC	Chloroform/Methanol/ddH ₂ O (60:35:8)
PBS	Sigma, Steinheim, Deutschland
PBST	PBS mit 0,4% Triton X-100

PFA 4%	40g Paraformaldehyde Powder 95% in 1l PBS bei 65°C im Wasserbad lösen. Aliquotieren und bei -20°C lagern.
PFA 8%	PFA 32% mit PBS auf 8% verdünnt.
Stopppuffer für Enzymaktivitätstest	0,4mol/l Glycin In ddH ₂ O auflösen pH = 10,8 (mit 6N NaOH einstellen)
Streptavidinlösung DC	2 µg Streptavidin – AP in 1 ml Blockierlösung auflösen
Testpuffer für Enzymaktivitätstest	27 mmol/l Natriumcitrat 46 mmol/l Natriumphosphat dibasic 6 mmol/l 4-MU-a-D-Galaktopyranosid 90 mmol/l N-acetyl-D-Galaktosamin In ddH ₂ O auflösen pH = 4,6 (mit 6N HCl einstellen)

Tabelle 10 Medien und Lösungen

1.5. Fliegenstämme

Gal4 - Treiberlinien		
Int. Bezeichnung (Ort der Expression)	Genotyp	Ursprung
Aktin Treiber (ubiquitär)	y[1] w[*] ; P{Act5C-GAL4-w}E1/CyO	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center Stock number: 25374
Dot-Gal4 Treiber (perikardiale Nephrozyten)	w[*]; P(Dot-Gal4,K) 11C	Karl Friedrich Fischbach
GCN Treiberlinie (Garlandzellen)	w[*]; P(Prospero-Gal4)	Barry Denholm
Kombinierter Treiber- und Reporterstamm (endogener Uptakeversuch)	MHC-ANF-RFP; Hand-GFP; Dot-Gal4	Han Labor, Ithaca, U.S.A.

Tabelle 11 Gal4-Treiberstämme.

UAS – RNAi - Linien		
Int. Bezeichnung (Kürzel)	Genotyp	Ursprung
C1: Kirre	UAS-CG3653-RNAi	CG3653 VDRC ID: 27227/GD
CG5731 RNAi (A38)	w[1118]; P{GD5371}v15543	VDRC ID: v15543
CG7997 RNAi (A36)	w[1118]; P{GD5827}v16840	VDRC ID: v16840
Doppel – RNAi (DRNAi)	w[1118]; P{GD5827}v16840; P{GD5371}v15543	Eigene Kreuzung

Tabelle 12 UAS-RNAi-Linien.

Knockout - Linien		
Int. Bezeichnung (Kürzel)	Genotyp	Ursprung
CG5731 k/o („k/o 1“)	y[1] w[1118]; PBac{w[+mC]=5HPw[+] }CG5731 [A076]	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center Stock number: 16032
CG5731 k/o („k/o 2“)	PBac{PB}CG5731c ⁰⁴⁰⁷⁴	Exelixis at Harvard Medical School
CG5731 k/o („k/o 3“)	PBac{WH}CG5731f ⁰⁰⁰⁹⁴	Exelixis at Harvard Medical School
CG5731 k/o („k/o 4“)	PBac{WH}CG5731f ⁰⁶²⁸¹	Exelixis at Harvard Medical School
CG7997 k/o (N2)	y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2]=MIC}CG7997[MI 05592]	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center Stock number: 41425

Tabelle 13 Knockoutlinien.

Andere Linien		
Int. Bezeichnung	Genotyp	Ursprung
CG7997-GFP Reporterlinie	FlyFos022526(pRedFlp-Hgr)(CG799718957::2XTY1-SGFP-V5-preTEV-BLRP-3XFLAG)dFRT	VDRC ID: 318856
Curly Markerstamm	w(+); Kr(lf-1)/ CyO; D(1)/TM6C,Sb(1)Tb(1)	BDSC
Serrate Markerstamm	w[*]; Kr(lf-1)/CyO; D[1]/TM3, Ser[1]	BDSC
WTB	wildtyp ^{berlin}	Karl Friedrich Fischbach

Tabelle 14 Andere Fliegenlinien.

1.6. Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems GmbH, München
DAVID Bioinformatics Resources 6.8	https://david.ncifcrf.gov/
FastQC	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla, U.S.A.
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
NIS-Elements AR Analysis	Nikon, Tokio, Japan
NIS-Elements Viewer 4.20	Nikon, Tokio, Japan
PathView	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/pathview.html
SeqMonk	http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/seqmonk/
TopHat	http://tophat.cbcb.umd.edu
TrimGalore	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
Zen 2	Zeiss

Tabelle 15 Software

1.7. Online Tools

Tool	URL
DIOPT - DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool, Harvard Medical School	http://www.flyrnai.org/diopt
E! Ensemble	www.ensembl.org
FlyBase	www.flybase.org
HUGO Gene Nomenclature Committee	http://www.genenames.org
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	www. genome.jp/kegg/pathway.html
NCBI Basic Local Alignment Search Tool	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
SWISS Model	https://swissmodel.expasy.org/

Tabelle 16 Online Tools

1.8. Firmen

Firma	URL
GATC Biotech	https://www.gatc-biotech.com/de/index.html

Tabelle 17 Firmen.

2. Methoden

2.1. Arbeiten mit *Drosophila*

2.1.1. Haltung der Fliegen

Die Fliegenhaltung erfolgte in durchsichtigen Plexiglasgefäßen, die ca. 2-3 cm hoch mit *Drosophila* Futtermedium gefüllt waren. Auf den festen Futterbrei wurde mit einer Spritze 2-3 ml frische, mit Wasser leicht angefeuchtete Hefe gegeben. Adulte Fliegen nehmen diese besser an als den Futterbrei, der hauptsächlich der Ernährung der drei Larvenstadien dient.

Um die Oberfläche im Glas zu vergrößern und überschüssige Feuchtigkeit aufzunehmen, wurde in jedes Glas ein aufgerolltes Filterpapier eingebracht. Verschluss wurden die Gläser mit luftdurchlässigen Ceaprenstopfen.

Fliegenkulturen sind anfällig für den Befall durch verschiedene Milbenstämme. Um die Kontamination der Gläser untereinander zu minimieren, wurden diese in wasserdichten Plastikbehältern gelagert, deren Boden mit Wasser und Spülmittel (um die Oberflächenspannung herabzusetzen) gefüllt war. Der Wanderung von Milben zwischen benachbarten Gläsern konnte so vorgebeugt werden. Außerdem wurden die Gläser regelmäßig von außen mit Milbenspray behandelt.

Die Haltung erfolgte bei 19°C (Stammsammlung) oder bei 29 °C (Gal4/UAS Kreuzungen) in einem Inkubator mit definiertem Hell-Dunkel-Zyklus, oder bei Raumtemperatur.

2.1.2. Haltung der Fliegen auf silbernitrat haltigem Futterbrei

2.1.3. Kreuzen der Fliegen

Um eine F1-Generation eines bestimmten Genotyps zu erhalten ist es wichtig, eine Verpaarung mit ausschließlich unbefruchteten Weibchen anzusetzen. Weibliche Fliegen werden erst 6 Stunden nach dem Schlupf aus der Puppe geschlechtsreif, daher nutzt man dieses Zeitfenster für Kreuzungsexperimente.

Diese jungen, unbefruchteten Fliegen unterscheiden sich von adulten Fliegen durch ihre helle, fast weiße Körperfärbung und den Mekoniumfleck, einem dunkelbraunen Fleck in ihrem Abdomen.

Für eine Kreuzung werden 5-10 dieser Jungfrauen mit 10 männlichen Tieren undefinierten Alters in ein mit Futterbrei und Hefe gefülltes Glas gegeben.

Männliche Tiere sind deutlich kleiner als weibliche, und können von diesen sowohl anhand ihrer dunkel gefärbten äußeren Geschlechtsorgane als auch der Geschlechtshämme an den Tibien unterschieden werden.

Gehalten wurden die Kreuzungen bei 29°C, um eine größtmögliche Expression des Gal4 Transkriptionsfaktors zu garantieren. Nach einigen Tagen wurde die P-Generation aus dem Glas entfernt, und der Schlupf der F₁ Generation abgewartet.

2.1.4. Gal4/UAS – System

Um eine zelltypspezifische Expression bestimmter Gene (in dieser Arbeit insbesondere RNA-Interferenz) zu erlangen, wurde das Gal4/UAS – System verwendet. Da dieses System temperaturabhängig ist, wurden die Kreuzungen aus Gal4 Stämmen mit UAS Stämmen in einem Inkubator bei 29 Grad Celsius gehalten.

2.1.5. RNA-Interferenz

Die verwendeten UAS-RNAi Linien stammen aus dem Vienna *Drosophila* Research Center (VDRC).

2.1.6. Erstellung einer stabilen UAS-DoppelRNAi Linie

Um den phänotypischen Effekt eines RNAi-Knockdowns beider relevanter Gene untersuchen zu können, wurde für diese Arbeit eine mit Gal4 exprimierbare Doppel-Knockdown-Linie zusammengekreuzt. Im Folgenden wird das verwendete Kreuzungsschema mithilfe der beiden Balancerchromosomen *Curly* und *Serrate* dargestellt.

Schritt 1a

Parentalgeneration	<u>CyO ; Tm3::ser</u> x ; y	<u>CG5731 RNAi ; +</u> CG5731 RNAi ; +
F1-Generation	<u>CyO ; Tm3::ser</u> CG5731 RNAi ; +	

➔ Sammeln des Phänotyps *Curly* und *Serrate*

Schritt 1b

Parentalgeneration	<u>CyO ; Tm3::ser</u> x ; y	<u>+ ; CG7997 RNAi</u> + ; CG7997 RNAi
F1-Generation	<u>CyO ; Tm3::ser</u> + ; CG7997 RNAi	

➔ Sammeln des Phänotyps *Curly* und *Serrate*

Schritt 2a

Parentalgeneration	<u>CyO ; Tm3::ser</u> CG5731 RNAi ; +	<u>CyO ; Tm3::ser</u> CG5731 RNAi ; +
F1-Generation	<u>CG5731 RNAi ; Tm3::ser</u> CG5731 RNAi ; +	

➔ Sammeln des Phänotyps *Serrate*

Schritt 2b

Parentalgeneration	<u>CyO ; Tm3::ser</u> + ; CG7997 RNAi	<u>CyO ; Tm3::ser</u> + ; CG7997 RNAi
F1-Generation	<u>+ ; CG7997 RNAi</u> CyO ; CG7997 RNAi	

➔ Sammeln des Phänotyps *Curly*

Schritt 3

Parentalgeneration	<u>CG5731 RNAi ; Tm3::ser</u> CG5731 RNAi ; +	<u>+ ; CG7997 RNAi</u> CyO ; CG7997 RNAi
F1-Generation	<u>CG5731 RNAi ; Tm3::ser</u> CyO ; CG7997 RNAi	

➔ Sammeln des Phänotyps *Curly* und *Serrate*

Schritt 4

Parentalgeneration	<u>CG5731 RNAi ; Tm3::ser</u>	<u>CG5731 RNAi ; Tm3::ser</u>
	CyO ; CG7997 RNAi	CyO ; CG7997 RNAi
F1-Generation	<u>CG5731 RNAi ; CG7997 RNAi</u>	
	CG5731 RNAi ; CG7997 RNAi	

➔ Sammeln des Phänotyps Wildtyp

Die so erstellte Linie ist stabil doppelt-homozygot und konnte für Kreuzungen mit den entsprechenden Gal4-Treiberlinien herangezogen werden.

2.2. Präparation der Nephrozyten

2.2.1. Garland-Zellen

Die Präparation der Garland Zellen erfolgte aus dem 3. Larvenstadium. Die Garlandzellen liegen an der Basis des Proventriculus perlenschnurartig um den Ösophagus. Als Präparierwerkzeug dienten zwei 18 und zwei 20 Gauge Kanülen, die Präparation erfolgte mit Hilfe eines Binokularmikroskops. (Abbildung 9)



Abbildung 9 Präparierbank für Garlandzellen der Larve 3.

(1) Pinzette zur Entnahme der Larven aus dem Glas (2) Präparierwerkzeug, 1 ml Spritzen mit aufgesetzten 18 G Kanülen (3) Präparierwerkzeug, 1 ml Spritzen mit aufgesetzten 20 G Kanülen (4) 0,2 ml PCR-Softtube (5) Pasteurpipette zum Überführen der Präparate in das PCR-Tube (6) 20 ml Spritze mit eiskaltem PBS (7) Mikroskopiernapf auf Eisbank, mit PBS gefüllt (8) wasserfester Stift zum Beschriften des PCR-Tubes (9) Alu-Rack auf Eis

Die Larve wurde mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig in einen Mikroskopiernapf auf Eis überführt und mit eiskaltem PBS bedeckt.

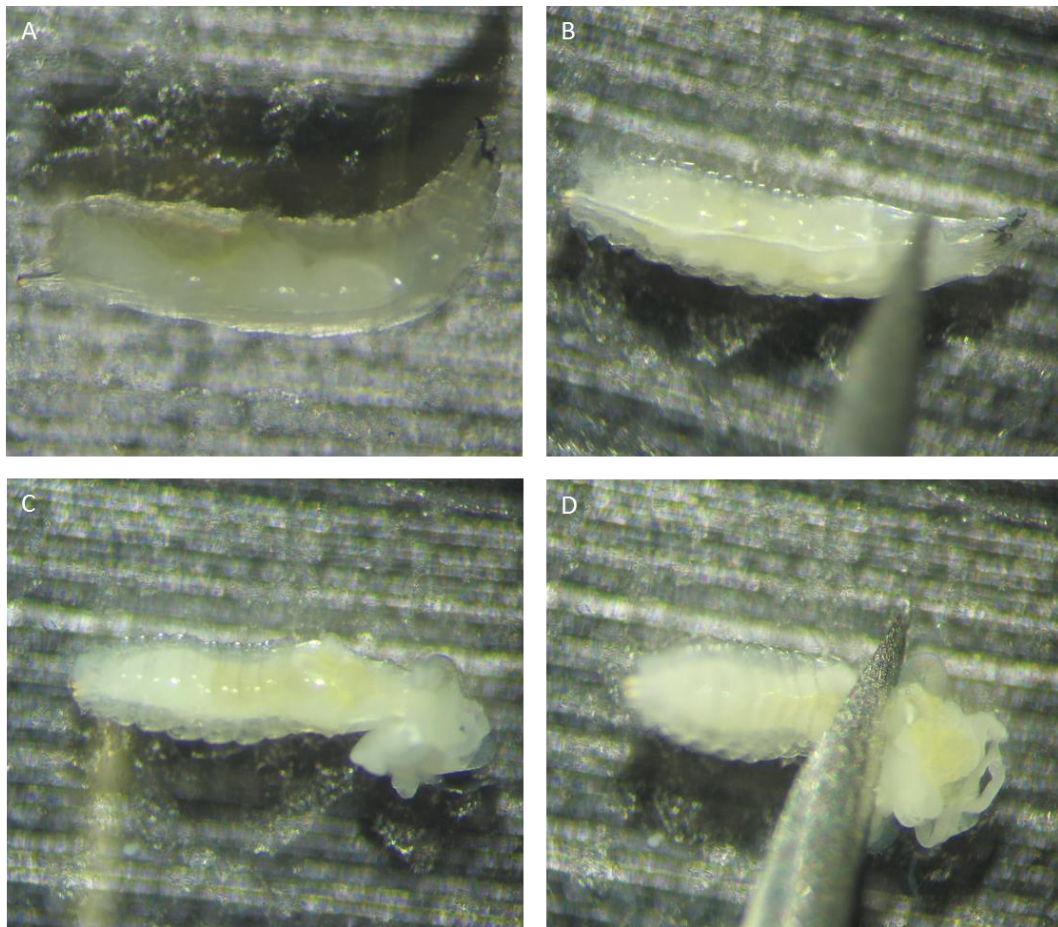


Abbildung 10 Präpariervorgang Garlandzellen, erster Teil.

(A) drittes Larvenstadium in PBS (B) Abtrennen des Kopfes mit 20G Kanüle (C) Organkonvolut tritt hervor (D) Abtrennen des Organkonvolutes

Mit den Kanülenspitzen wurde mit einer scherenartigen Bewegung der Kopf der Larve abgetrennt, und das Organkonvolut trat hervor. Dieses wurde in einem sauberen Schnitt von der leeren Larvenhülle abgetrennt. (Abbildung 10)

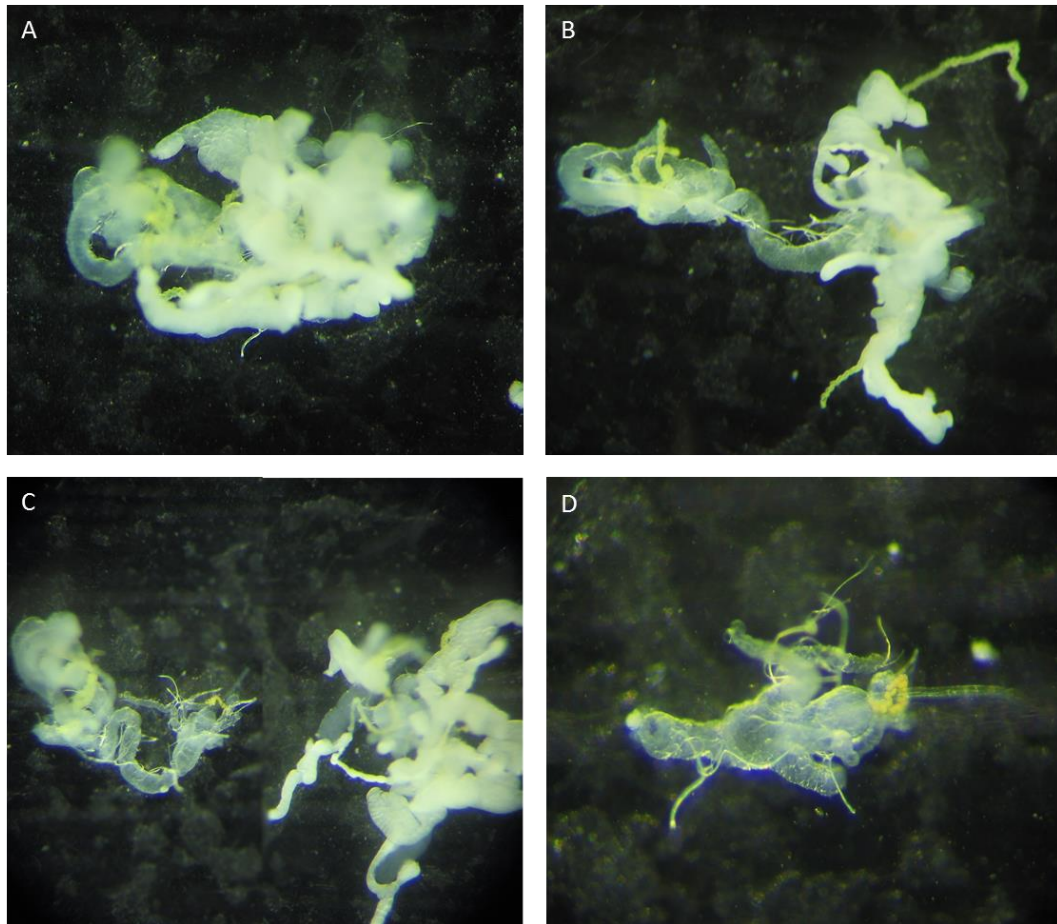


Abbildung 11 Präpariervorgang Garlandzellen, zweiter Teil.

(A) Organkonvolut (B) Malpighische Schläuche (gelb) durchtrennen und Organkonvolut ausrichten (C) unteren Darmteil mit linker Kanüle fixieren und Gehirn, Speicheldrüsen und Fettkörper mit rechter Kanüle nach rechts ziehen, bis er sich komplett ablöst (D) Ventrikulus mit Blinddärmen und Proventrikulus mit Garlandzellen (gelb durch Fütterung mit Silbernitrat)

Als erstes wurden die beiden Malpighischen Schläuche, die am Übergang zwischen Mittel- und Enddarm entspringen und in kranialer Richtung über die gesamte Länge der Larve ziehen, kurz vor ihrem Ursprung durchtrennt. Nun wurde das Konvolut so ausgerichtet, dass der Mitteldarm auf der linken Seite und die Fettkörper, das Gehirn und die Speicheldrüsen auf der rechten Seite lagen. Der Darmteil wurde mit der Kanüle in der linken Hand fixiert, und mit der Kanüle in der rechten Hand wurde mit einer raschen Bewegung der Gehirnteil nach rechts gezogen. So löst er sich vom Proventrikulus und den Garlandzellen, ohne diese zu beschädigen. (Abbildung 11)

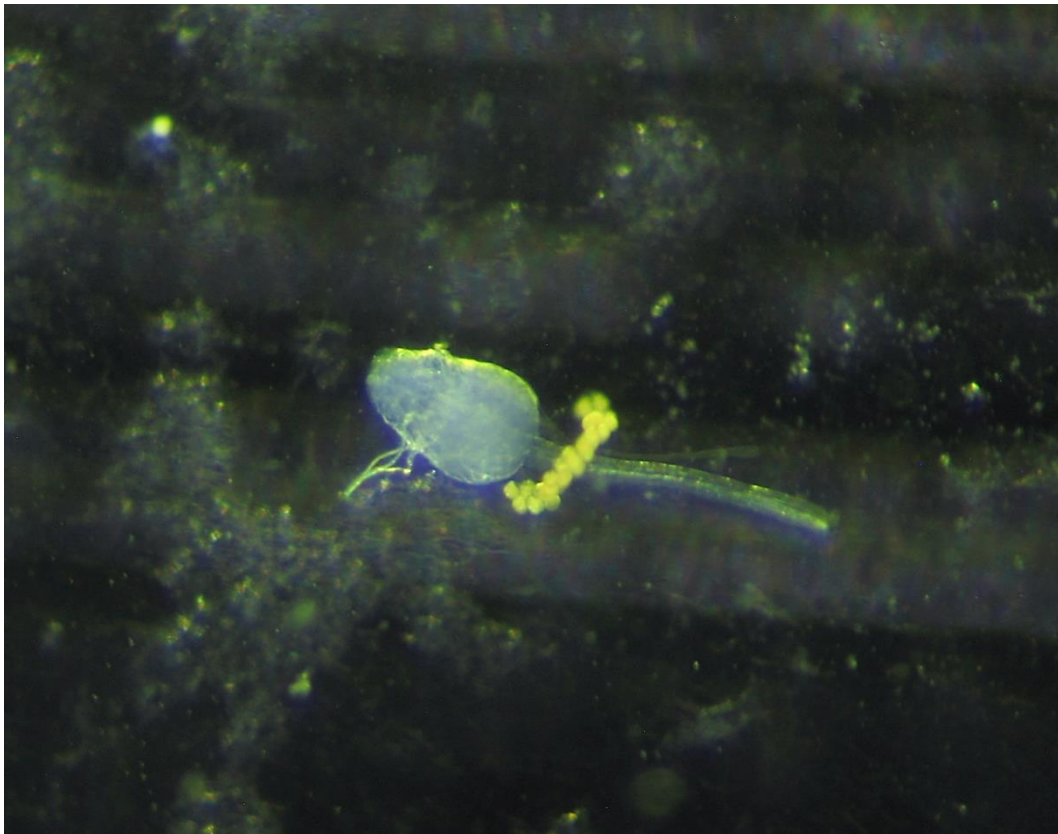


Abbildung 12 Fertiges Garlandzell-Präparat.

Die Garlandzellen sind zur verbesserten Übersicht durch Silbernitratfütterung der Larve gelb gefärbt.

Die fertig präparierten Zellen (Abbildung 12) wurden mit einer Pasteurpipette in PBS in ein PCR-Tube überführt und sofort für die Weiterverarbeitung entsprechend des jeweiligen Protokolls fixiert.

2.2.2. Perikardiale Nephrozyten

Die Präparation der Perikardialen Nephrozyten erfolgte in der adulten Fliege, mit Hilfe eines Binokularmikroskops. Als Präparierwerkzeug dienten eine feine Schere, eine dünne Pinzette und eine Akupunkturnadel. (Abbildung 13)



Abbildung 13 Präparierbank für perikardiale Nephrozyten der adulten Fliege.

(1) CO₂-Pistole (2) Schnorchel zur Entnahme der Fliegen aus dem Glas (3) Mikroskopiernapf zur Aufbewahrung der zu präparierenden Fliegen (4) Vaseline (5) Mikroskopiernapf auf Eisbank zur Präparation (6) Pinzette (7) Spatel zur Entnahme der Vaseline (8) Schere (9) Akupunkturnadel (10) 20 ml Spritze mit PBS (11) wasserfester Stift zur Beschriftung der Tubes (12) Alu-Rack für PCR-Tubes und 1,5 ml Eppendorfgefäße (13) PCR-Softtube

Die zu präparierenden Fliegen wurden mit der CO₂-Pistole anästhesiert und in einem Mikroskopiernapf bis zur Präparation auf Eis gelagert. Mit der Pinzette wurde eine der Fliegen ausgewählt und auf einen zweiten, größeren Mikroskopiernapf auf einer Eisbank transferiert.

Dann wurde die Fliege mit der Kutikula der dorsalen Seite des Abdomensegments mit Vaseline auf den Mikroskopiernapf geklebt (Abbildung 14 A). Mit der Schere wurde zwischen Thorax- und Abdomensegment ein Schnitt gesetzt (Abbildung 14 B und C), und Kopf und Thorax verworfen (Abbildung 14 D). Nun wurde eiskaltes PBS in die Schale gegeben, um die Präparation zu erleichtern und das Austrocknen der Zellen zu verhindern.

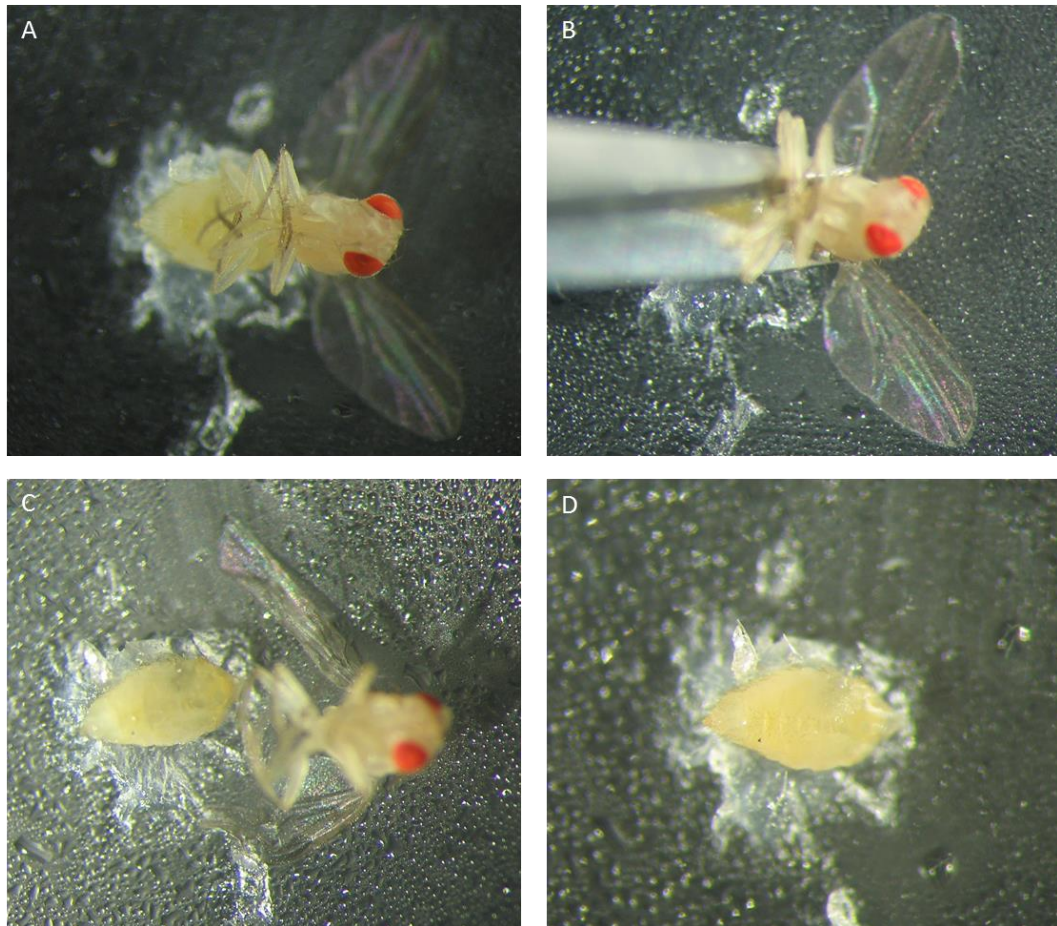


Abbildung 14 Präpariervorgang perikardiale Nephrozyten, erster Teil.

(A) Fliege wird mit Vaseline auf Mikroskopiernapf geklebt (B) Thoraxsegment wird mit einer Schere von Abdomensegment getrennt (C) Abgetrenntes Thorax- und Abdomensegment (D) Abdomensegment vor Zugabe von PBS

Der ventrale, oben liegende Teil des Abdomensegments wurde mitsamt der Organe so abpräpariert, dass nur noch der dorsale Teil der Kutikula mit Herzschauch, perikardialen Nephrozyten und Fettgewebe in der Präparierschale verbleibt. (Abbildung 15) Hier musste äußerst vorsichtig und sorgfältig vorgegangen werden, um die Nephrozyten, die an den sie umgebenden Organen durch feine Verbindungen befestigt sind, keinen unnötigen Zugkräften auszusetzen.

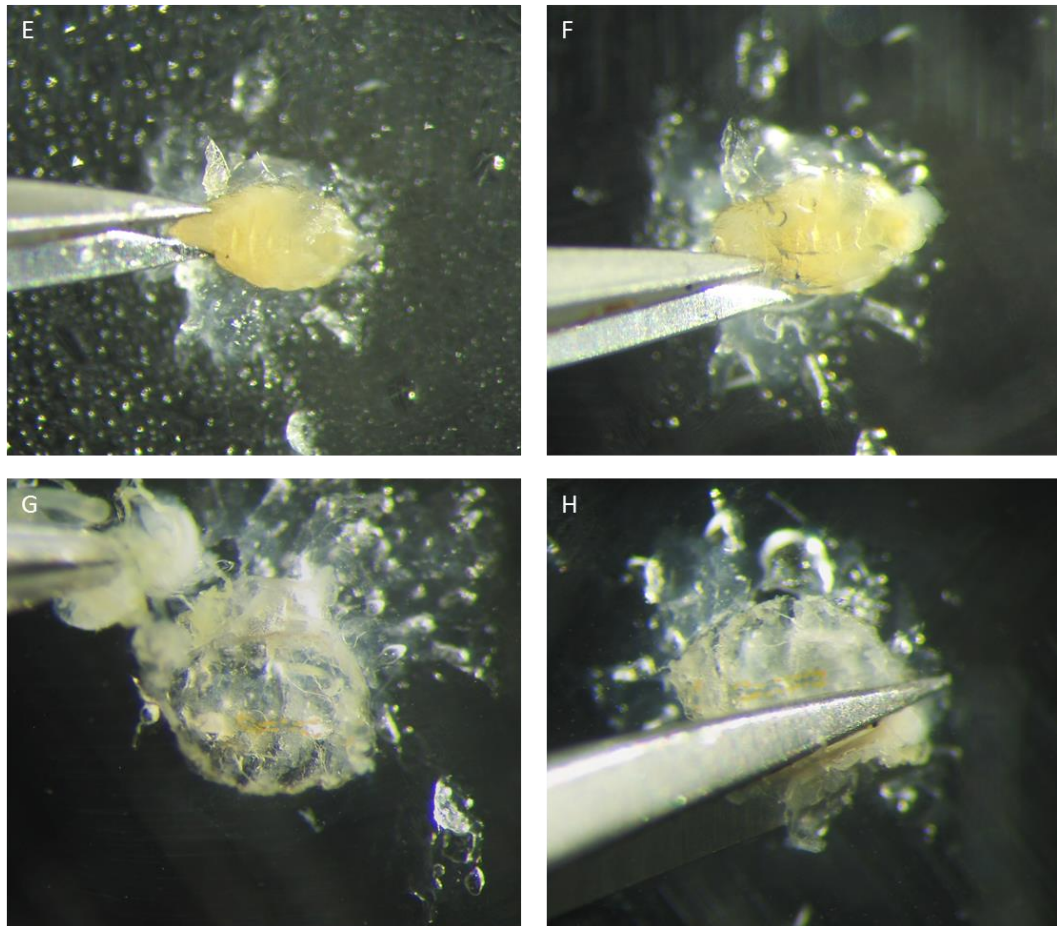


Abbildung 15 Präpariervorgang perikardiale Nephrozyten zweiter Teil.

(E) erste Schnittführung: frontaler Schnitt am kaudalen Ende des Abdomensegments (F) zweite Schnittführung: frontaler Schnitt entlang des lateralen Rands des Abdomensegments (G) Aufklappen des ventralen Teils und entfernen des Organkonvoluts (H) Zuschneiden der Ränder des Präparates

Falls nötig, konnte das umliegende Fettgewebe nun noch mit Pinzette und Akupunkturnadel entfernt werden, ohne dabei die Nephrozyten zu beschädigen.

Das fertige Präparat (Abbildung 16) wurde mit der Pinzette an die Wand eines mit eiskaltem PBS gefüllten PCR-Tubes transferiert. So konnten Fixation und Waschungen durchgeführt werden, ohne das Präparat zu beschädigen.

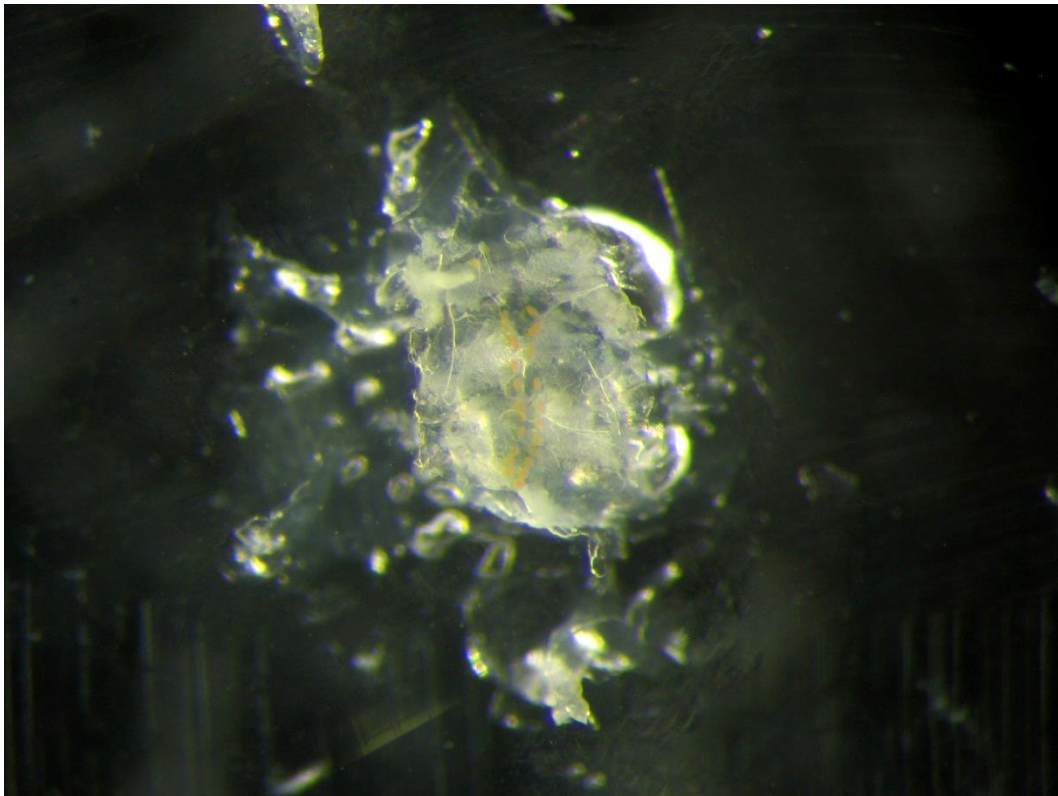


Abbildung 16 Fertiges Präparat der perikardialen Nephrozyten.
Die PN sind zur Verbesserung der Sichtbarkeit mit Silbernitrat gelb gefärbt.

2.3. Histologische Methoden

2.3.1. Immunfluoreszenzfärbung

Die perikardialen Nephrozyten wurden wie beschrieben präpariert und in ein 0,2 ml PCR Softtube überführt. Die Fixation erfolgte mit 4% PFA in PBS für 7 Minuten bei Raumtemperatur, darauf folgte ein Waschschrift mit kaltem PBS und 3 Waschschriften mit 0,4% PBS-T (je 5 Minuten, auf Eis). Geblockt wurde mit 5% bovinem Serum Albumin in PBS für eine Stunde bei 37°C. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht, wieder gefolgt von den oben genannten Waschschriften. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte bei 4 °C für 2 Stunden, danach wurde wieder wie beschrieben gewaschen.

Die so gefärbten Präparate wurden auf Objektträger überführt und mit Vectashield HardSet™ eingedeckelt. Da die Präparate der perikardialen Nephrozyten deutlich dicker sind als die der Garlandzellen, wurde auf jeden Objektträger ein Spacer aus 3 übereinander geklebten Tesafilmstreifen angebracht, um die Präparate nicht zu zerquetschen. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

Die Bilder wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen.

2.3.2. Uptakeversuch mit Silbernitrat

Für den Uptakeversuch mit Silbernitratfütterung wurde die Parentalgeneration der auszuwertenden Fliegen auf einem mit Silbernitrat versetzten Futtermedium gehalten.

Die Zubereitung dieses Toxinbreis erfolgte nach Lőrincz et al.¹⁰⁸. Dazu wurde der reguläre Futterbrei unter Rühren bei 500 Watt in einer Mikrowelle verflüssigt. Anschließend wurde in Aqua dest. gelöstes Silbernitrat bis zu einer Konzentration von 0,005% hinzugefügt und der Brei 5 Minuten lang gewissenhaft verrührt.

Sobald ein homogenes Gemisch entstanden war, wurde es in saubere Drosophila Gläser abgefüllt (Füllhöhe ca. 2 cm) und ohne Deckel über Nacht bei Raumtemperatur auskühlen gelassen. Am nächsten Morgen wurden die Gläser mit Ceaprenstopfen versehen und bis zur Verwendung zur Lagerung auf 4°C transferiert.

Die Parentalgeneration legte ihre Eier auf dem Toxinbrei ab, und die daraus schlüpfenden Larven nahmen über ihre gesamte Lebensspanne bis zum 3. Larvenstadium nur diesen Brei auf. Diese Larven wurden wie beschrieben präpariert und die durch das Silbernitrat gelb gefärbten Garlandzellen ohne zusätzliche Färbung mit Vectashield® eingedeckelt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte lichtmikroskopisch mit einem aufrechten Durchlichtmikroskop von Zeiss, die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Vor Aufnahme der Bilder wurden die Präparate für 30 Sekunden mit dem DAPI-Laser (389 nm) des Mikroskops belichtet, um die Silbernitrateinschlüsse in der Zelle braun zu färben und dadurch die Sichtbarkeit zu erhöhen.

2.3.3. Albumin Uptake

Die perikardialen Nephrozyten wurden wie beschrieben präpariert und in ein 0,2 ml PCR Tube auf Eis überführt.

Direkt nach der Präparation wurden die Zellen für eine Minute mit raumtemperiertem PBS gewaschen, um eine optimale Endozytosefunktion zu gewährleisten. Danach wurden die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 µl FITC-Albumin (0,2 mg/ml in PBS) inkubiert. Darauf folgten 4 gründliche Waschschrte mit eiskaltem PBS und sofort im Anschluss die Fixation mit 8% PFA in PBS.

Nach der Fixation wurde wieder drei Mal kurz mit PBS gewaschen, danach wurden die Präparate auf einen Objektträger mit drei Lagen Tesafilm als Spacer überführt und mit Vectashield HardSet™ eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanning Mikroskop.

2.3.4. Rasterelektronenmikroskopie

Die perikardialen Nephrozyten wurden wie beschrieben präpariert und in ein mit Bouin Lösung gefülltes 0,2 ml PCR Tube überführt. So fixiert wurden die Präparate über mehrere Tage bei 4°C gelagert.

Anschließend folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%), bei der jede Konzentration für 30-45 Minuten inkubiert wurde. Der 70% Ethanol wurde dabei mehrmals ausgetauscht, um die in Bouin Lösung enthaltene Pikrinsäure komplett herauszulösen.

Auf den 100% Ethanol folgte ein Gemisch aus gleichen Teilen Ethanol und Hexamethyldisilazan (HMDS), danach wurden die Präparate in 100% HMDS luftgetrocknet.

Sobald die Präparate komplett trocken waren, wurden sie mit einer 27 G Kanüle auf die klebende Leitfolie eines Aluminiumprobentellers überführt und mit der dorsalen Seite des Panzers nach unten festgeklebt. Die Lagerung erfolgte bis zur Bedampfung mit Gold bei Raumtemperatur in einer Plastikbox mit Silica-Gel, um eine Rehydrierung der Proben zu vermeiden.

Die Bedampfung mit Gold wurde unter Argonatmosphäre mit einem Sputter Coater von Cressington durchgeführt und die Bilder an einem Rasterelektronenmikroskop von LEO Electron Microscopy Ltd. aufgenommen.

2.3.5. Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Ultrastruktur der perikardialen Nephrozyten wurden in Kooperation mit PD Dr. Oliver Kretz und der Abteilung für Neuroanatomie des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Für diese Aufnahmen wurden die perikardialen Nephrozyten wie beschrieben präpariert und auf Eis in ein 0,2 ml PCR Softtube überführt. Die Fixation erfolgte mit einer frisch angesetzten Lösung aus 100 µl 4% PFA in PBS und 4 µl 1% Glutardialdehyd über mehrere Tage bei 4°C.

Um die Handhabung der kleinen Präparate während der weiteren Arbeitsschritte zu erleichtern, wurde eine Voreinbettung in low-melting Agarose vorgenommen. Die Agarose wurde mit Aqua ad inj. angesetzt, eine Stunde quellen gelassen und anschließend unter Sichtkontrolle in der Mikrowelle mehrfach aufgekocht.

Währenddessen wurden die fixierten Zellen eine Stunde lang bei 4°C in PBS gewaschen. Dabei wurde das PBS mehrfach gewechselt, um eine komplette Entfernung des Fixans sicher zu stellen. Direkt vor der Einbettung in den Agar wurde das PBS für einige Sekunden gegen Aqua ad inj. ausgetauscht, um ein Ausfallen der Mineralstoffe des PBS im Agar zu verhindern.

Danach wurde sofort die gerade noch flüssige, auf 40 °C temperierte Agarose in das PCR Tube gegeben, das Präparat mit einer 27 G Kanüle vorsichtig vom Gefäßrand abgelöst, und die Agarose aushärten gelassen.

Mit zwei Rasierklingen wurden die Agarblöcke anschließend auf die richtige Größe zugeschnitten und in Rollrandgläser mit PBS überführt. Darauf folgte die Kontrastierung und Einbettung in Durcopan (siehe Tabelle 18)

Arbeitsschritt	Inkubationszeit
Osmiumtetroxid 4% in Saccharosepuffer 6,86% 1:7 (Lichtempfindlich, Inkubation im Dunkeln)	1 h
Waschen in 0,1 M PB	3 mal
50% Ethanol	10 min
60% Ethanol	10 min
Stückkontrastierung mit 1% Uranylacetat in 70% Ethanol (Lichtempfindlich, Inkubation im Dunkeln)	1 h
80% Ethanol	10 min
90% Ethanol	10 min
96% Ethanol	10 min

100% Ethanol (Schnell arbeiten, Flüssigkeit nicht komplett abziehen um ein Austrocknen der Proben zu verhindern)	2 x 10 min
Propylenoxid	2 x 10 min
Propylenoxid / Durcupangemisch 2:1	1 h
Propylenoxid / Durcupangemisch 1:1 (Anschließend das Propylenoxyd für mind. 1h unter dem Abzug abdampfen lassen)	1 h
Reines Durcupan	4°C über Nacht
Einbettung der Proben mit Durcupan in Silikonformen (Die Proben vorsichtig mit einem Holzzahnstocher in die Form positionieren. Anschließend mit Durcupan auffüllen.)	-
Auspolimerisation (Wärmeschränk)	min 24 h bei 55°C

Tabelle 18 TEM Einbettungsprotokoll

Die anschließende Anfertigung von Ultradünnschnitten, die Nachkontrastierung mit Bleicitrat sowie die Aufnahme der Bilder wurden von Barbara Joch vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

2.4. Überlebenskurve

Pro Genotyp wurden 90 Fliegen, davon je 45 männliche und 45 weibliche Tiere, auf 3 *Drosophila* Gläser pro Genotyp aufgeteilt. Die Gläser enthielten den regulären *Drosophila* Futterbrei, dessen Oberfläche leicht angeritzt wurde, um die

Futteraufnahme für die Fliegen zu erleichtern. In einem zweiten, gleich aufgebauten Ansatz wurde dem Futterbrei 0,005% Silbernitrat zugesetzt (siehe Abschnitt 2.3.2).

Für die Messung der Überlebenszeit wurden die so präparierten Gläser auf den Kopf gedreht und mit dem Ceaprenstopfen nach unten bei Raumtemperatur am Fenster ohne direkte Sonneneinstrahlung gelagert. So konnte das Festkleben der Fliegen am Futterbrei minimiert werden, und tote Fliegen konnten auf den weißen Ceaprenstopfen fallen und dort bequem ausgezählt werden, ohne die Fliegenkultur zu stören.

Der Transfer in frische Behälter erfolgte alle 3-5 Tage, je nach Zustand des Futterbreis, ohne CO₂-Anästhesie mit dem selbstgebaute Fliegenschnorchel. Bei dieser Prozedur entkommene Fliegen wurden in der Auswertung zensiert.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism, die Darstellung erfolgte in Form einer klassischen Kaplan-Meier-Kurve.

2.5. Enzymaktivitätstest

Die Messung der α -Galaktosidase A Aktivität wurde nach der Methode von Mayes et al. durchgeführt¹⁰⁹. Dabei diente 4-Methylumbelliferyl- α -D-Galaktopyranosid als Substrat und N-Acetyl-D-Galaktosamin als kompetitiver Hemmstoff für das Enzym N-Acetyl- α -D-Galaktosaminidase.

Je 100 Fliegen pro Genotyp (zu gleichen Teilen männliche und weibliche Tiere) wurden mit Kohlenstoffdioxid anästhesiert und in ein Precellys 2,5 ml Tube mit Keramikbeads auf Eis überführt. Nach Zugabe von 1000 μ l eiskaltem Lysepuffer wurden die Fliegen für 30 Sekunden bei 5000 rpm lysiert.

Das entstandene Gemisch wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert, dann kurz geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei 4 °C und 13,2 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße auf Eis überführt und direkt im Anschluss eine Proteinkonzentrationsmessung mit dem Nanodrop durchgeführt.

Die Proben wurden dann zusammen mit einer standardisierten Verdünnungsreihe aus aGLA auf eine schwarze 96 well Mikroplatte aufgetragen, je 10 μ l Probe pro well und je drei Ansätze für jeden Messwert (Abbildung 17). Dann wurden je 25 μ l Testpuffer pro Well hinzugegeben.

Der Blank wurde genotypspezifisch angesetzt: die Hälfte der aufgetragenen

Proben wurde mit einem Gemisch aus 25 µl Testpuffer und 35 µl Stopppuffer versetzt.

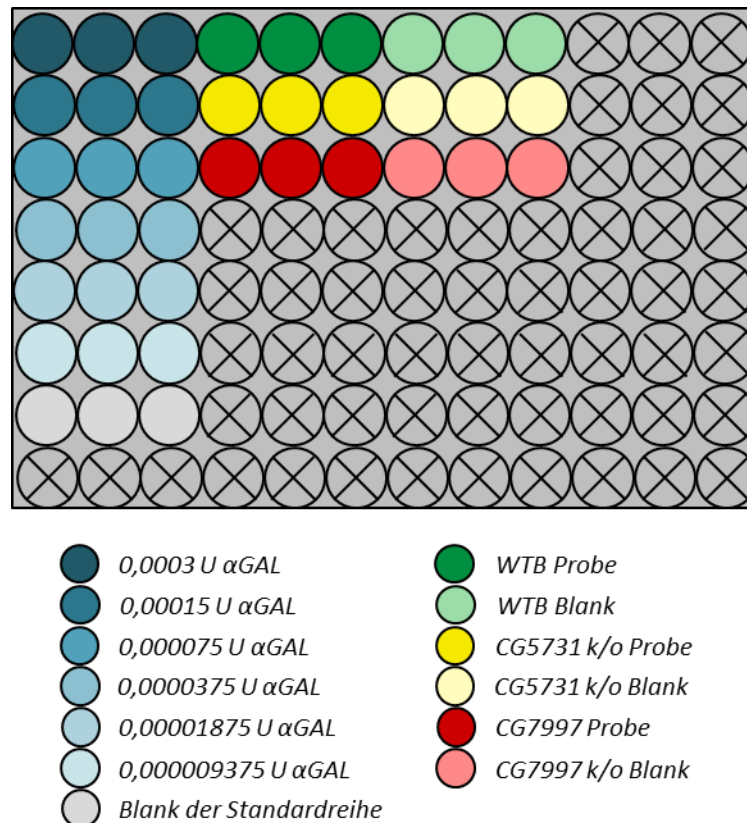


Abbildung 17 Enzymaktivitätstest, Beladung der 96-well Mikroplatte.

Eigene Grafik.

Die Inkubation erfolgte bei 21 Grad für eine Stunde. Danach wurde die Reaktion mit je 35 µl Stopppuffer beendet (exkl. der genotypspezifischen Blanks) und eine Fluoreszenzintensitätsmessung mit dem Tecanreader durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 355 nm, ausgelesen wurde bei 455 nm.

Die so erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden anschließend auf die jeweilige Proteinkonzentration genormt.

2.6. Endogener Uptakeversuch

Die Kreuzung weiblicher Jungfrauen des Reporterstammes mit männlichen Fliegen der beiden UAS-RNAi-Stämme wurde zunächst in den üblichen Drosophilagläsern für 72h bei 25°C durchgeführt. Anschließend wurden die Elterntiere für 24h auf Traubensaft-Agarplatten überführt und bei 25°C gelagert, so dass sie ihre Eier ablegen konnten. Als Gefäß diente ein großes, auf dem Ceaprenstopfen stehendes Drosophilagefäß ohne Boden, auf welches die Traubensaftplatte oben aufgedrückt wurde. Nachdem die Fliegen aus der Narkose erwacht waren, wurde das Gefäß mit der Agarplatte nach unten umgedreht. Durch den Traubensaft im Agarboden werden die weiblichen Tiere zur Eiablage animiert, und im klaren Agar sind anschließend die Larven leichter zu erkennen.

Nachdem die Parentalgeneration ihre Eier abgelegt hatte, wurde diese entfernt und die Traubensaftplatte mit einem Petrischalendeckel verschlossen. Die Lagerung erfolgte für 48h in einem Inkubator bei 29°C. Die erhöhte Temperatur diente der Optimierung der Expression des Gal4/UAS-Systems. Die Ränder der Petrischalen wurden mit Parafilm versiegelt, damit die sich entwickelnden Larven nicht aus dem Gefäß entkommen können. 48 Stunden nach der Eiablage sind in dem Agarboden unterschiedliche larvale Entwicklungsstadien zu finden.

Ein mit zwei Streifen doppelseitig klebendem Klebeband präpariertes Deckgläschen wurde auf einer Eisbank platziert, um die Beweglichkeit der Larven zu minimieren. Das Klebeband diente als Spacer und erleichterte das Aufkleben eines zweiten Deckgläschen. Zwischen die beiden Klebestreifen wurde ein Tropfen Vectashield® gegeben. Daraufhin wurden pro Genotyp 18-20 gleichgroße Larven im zweiten Larvenstadium gesammelt und nebeneinander mit dem Kopf in die gleiche Richtung auf das Deckgläschen gelegt. Anschließend wurden sie so gedreht, dass der Larvenkörper mit den Tracheen (und damit die perikardialen Nephrozyten) nach oben lagen. Nach dieser Ausrichtung wurde ein weiterer Tropfen Vectashield® auf die Larven gegeben, die Folie der Klebestreifen entfernt und ein zweites Deckglas auf die Larven aufgeklebt. Die Präparate wurden anschließend mit drei Holzwäscheklammern fixiert, damit die noch lebenden Larven nicht aus dem Präparat entkommen können.

Nach Lagerung bei 4°C über Nacht wurden die Präparate an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Im GFP-Kanal (488 nm) wurden die perikardialen Nephrozyten an der dorsalen Seite der Larven aufgesucht und scharf gestellt. Anschließend wurde ein für alle Aufnahmen festgelegtes Bild als

sogenannter „Reuse“ der Kameraeinstellungen verwendet, um die Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten untereinander zu gewährleisten. Pro Genotyp wurden 10 Aufnahmen im GFP und RFP-Kanal gemacht und im Anschluss mit der Software Picasa für jeden Genotyp eine Übersichtscollage angefertigt. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit dem Programm CellProfiler.

2.7. Nachweis von Globotriaosylceramid

2.7.1. Dünnschichtchromatographie

60 adulte Fliegen (gleiche Teile männliche und weibliche Tiere) wurden mit CO₂ anästhesiert und in ein Precellys 2,5 ml Tube mit Keramikbeads überführt. Um die Zellstruktur zu zerstören, wurde das Tube in flüssigem Stickstoff für 5 Minuten schockgefroren. Anschließend wurden die Fliegen in 1ml PBS mit dem Minilys® personal homogenizer 3 mal für 30 Sekunden bei 5000 rpm lysiert und dann 2 Minuten bei 13,3 g zentrifugiert, um die Panzerreste von dem Lysat zu trennen. Der klare Überstand wurde in einen Glaskolben überführt. Die anschließende Extraktion erfolgte modifiziert nach der Methode von Bligh and Dyer, 1959.

Der wässrige Fliegenextrakt (ca. 800 µl) wurde mit 4 ml Chloroform/Methanol 2:1 versetzt und eine Minute bei Raumtemperatur gevortext.

Anschließend wurden 1,25 ml ddH₂O und 1,25ml Chloroform zugegeben, erneut gevortext und danach 10 Minuten bei 15°C und 3000 rpm zentrifugiert. Die beiden so entstandenen Phasen konnten anschließend mit einer Pasteurpipette voneinander getrennt werden. Die untere, organische Phase (Chloroformphase), welche die Lipide enthält, wurde in einem zweiten Glastube gesammelt und unter N₂ verdampft, um eine Oxidation der Lipide zu verhindern.

Die obere, hydroalkoholische Phase wurde erneut mit 1,5 ml Chloroform gewaschen und zentrifugiert, um eventuell verbleibende Lipide zu lösen.

Die Lagerung des eingedampften Extrakts erfolgte bei -20 °C unter Argongas zum Schutz der Lipide.

Der eingedampfte Lipidmix wurde in 700 µl Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und zusammen mit einem Gb3-Standard auf zwei Silicagel DC-Platten aufgetragen.

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 60% Chloroform, 35% Methanol und 8% Wasser verwendet.

Für die unspezifische Prädetektion wurden 70 µl Anisaldehyd mit 10 µl eines Gemischs aus 90% Methanol, 5% Essigsäure, 5% Schwefelsäure versetzt und diese Lösung mit einem Vernebler aus Glas auf die erste DC-Platte aufgesprüht. Die Entwicklung erfolgte für 15-20 Minuten bei 120°C. Das Chromatogramm wurde mit dem Fusion FX (Vilber Lourmat) dokumentiert.

Für die spezifische Detektion mit biotinyliertem StxB wurde die DC-Platte zunächst mit 15 g Polyisobutylmethacrylate in 400 ml n-Hexan fixiert. Danach wurde die so fixierte Platte für 15 Minuten mit 3 ml Blockierungslösung inkubiert und daraufhin das biotinylierte StxB (1.8 µg/ml in Blockierungslösung) hinzugegeben. Die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach zwei Mal mit PBS gewaschen, um das nicht gebundene bStxB zu entfernen.

Daraufhin wurde die Platte für eine Stunde mit dem mit AP konjugierten Streptavidin (2 µg/ml in Blockierlösung) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde für 10-15 Minuten der Substratpuffer auf die Platte gegeben, welcher BCIP und NBT enthält und damit die Banden sichtbar macht.

Falls das Signal zu schwach war, wurde die Platte über Nacht mit dem Substratpuffer inkubiert.

2.7.2. Histochemische Färbung mit Lektinen

Die histochemische Färbung wurde mit Cy5-markiertem Shiga-like Toxin, Untereinheit B durchgeführt. Das Protokoll entspricht dem der Immunfluoreszenzfärbung, die Lektine wurden zusammen mit dem Sekundärantikörper der Kofärbung für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Bilder wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM) von Nikon aufgenommen.

2.8. RNAseq

Für die Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNAseq) wurden je 100 Fliegen eines Genotyps in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in 700 µl GTC-Lysepuffer mit dem PreCelllys MiniLys (Behälter #KT03961-1-003.2) drei Mal für 30 Sekunden lysiert. Das Alter der Fliegen betrug 0-7 Tage, es wurden zu gleichen Teilen männliche und weibliche Tiere verwendet. Die Alle weiteren Schritte der RNA Isolation mit Aquaphenol und Chloroform wurden freundlicherweise von Frau Charlotte Meyer im Zentrum für klinische Forschung durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte anschließend durch die Firma GATC

(Konstanz).

Die Auswertung der Daten wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Nicola Wanner durchgeführt. Die Qualitätskontrolle der Proben wurde mit FastQC durchgeführt, das Trimmen der sequenzierten cDNA Abschnitte erfolgte mit TrimGalore (Softwares der Bioinformatics Group des Babraham Institute). Für das Sequenzalignment wurde mit der Software TopHat¹¹⁰ gearbeitet, die Differenzielle Genanalyse wurde mit DESeq2^{111,112} durchgeführt.

III. ERGEBNISSE

1. Molekulare Analysen und Auswahl geeigneter *Drosophila* Stämme

1.1. Bioinformatische Analysen

Zu Beginn der experimentellen Arbeit wurden verschiedene bioinformatische Analysen durchgeführt, um das der humanen α -Galaktosidase A entsprechende Enzym in der Fliege zu ermitteln.

1.1.1. DNA - Sequenzhomologe

Die erste Homologiesuche erfolgte auf DNA Ebene. Für die Identifikation des Sequenzhomologs wurde mit *HGNC Comparison of Orthology Predictions (HCOP)* gearbeitet, einer Software des *HUGO Gene Nomenclature Committee*, welche die Ergebnisse verschiedener Online Alignment Tools zusammenfasst.

Für das Gen GLA, welches beim Menschen für die α -Galaktosidase A codiert, gibt es laut HCOP zwei Sequenzhomologe in der Fruchtfliege: CG5731 und CG7997 (Abbildung 18).

Human
 Approved symbol: **GLA**
 Approved name: galactosidase alpha
 Locus type: gene with protein product
 Chromosomal location: Xq21.3-q22
 Gene resources: HGNC:4296, ENSG00000102393, 2717

Drosophila
 Gene symbol: **CG7997**
 Gene name: CG7997 gene product from transcript CG7997-RB
 Locus type: protein_coding
 Chromosomal location: 2R
 Gene resources: FLYBASE:FBgn0034117, FBgn0034117, 36829
 Assertion derived from: [Icons]

Drosophila
 Gene symbol: **CG5731**
 Gene name: CG5731 gene product from transcript CG5731-RA
 Locus type: protein_coding
 Chromosomal location: 2L
 Gene resources: FLYBASE:FBgn0032192, FBgn0032192, 34355
 Assertion derived from: [Icons]

Abbildung 18 Suche nach Orthologen für GLA mit *HGNC Comparison of Orthology Predictions (HCOP)*

Die Suche nach DNA-Homologen der humanen GLA-Sequenz ergibt die beiden Fliegengene CG5731 und CG7997.

Das auf HCOP als Referenz angegebene Online Tool Ensembl gibt die Übereinstimmung der Sequenzen dieser beiden Fliegengene mit der humanen GLA Sequenz für CG7997 mit 44,6% und für CG5731 mit 45,52% an.

1.1.2. Aminosäuresequenzhomologe

Als zweiter Schritt wurde mithilfe des BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Algorithmus des National Center for Biotechnology Information (NCBI) nach Aminosäuresequenzhomologen der humanen α -Galaktosidase A (α GAL) in der Fliege gesucht.

Auch diese Suche ergab die Genprodukte der beiden Gene CG7997 und CG5731 mit einer Übereinstimmung von 46% beziehungsweise 47%, einem E-Wert von jeweils unter 0,0001 und damit einer sehr hohen Signifikanz (Abbildung 19).

		Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	CG5731 [Drosophila melanogaster]	400	400	90%	1e-137	47%	NP_609354.1
<input type="checkbox"/>	CG7997, isoform A [Drosophila melanogaster]	384	384	95%	4e-131	46%	NP_611119.1

Abbildung 19 NCBI BLAST Suche nach Aminosäuresequenzhomologen für α -Galaktose A in der Fliege

Eine BLAST-Suche nach Aminosäuresequenzhomologen der humanen α GAL in *Drosophila* ergibt ebenfalls die Genprodukte von CG5731 und CG7997.

1.1.3. Dreidimensionale Modellierung und Vergleich der aktiven Zentren

Um zusätzlich zu dem Vergleich der Aminosäuresequenzen auch Informationen zur Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zu erhalten, wurde mit dem Programm *SWISS-Model* ein dreidimensionales Modell der ermittelten Proteine erstellt^{113,114,115,116}.

Die humane α -Galaktosidase A ist ein Homodimer mit 2 Bindungsstellen für α -Galaktose. Die dreidimensionale Struktur des Enzyms wurde mittels Röntgenbeugung Kristallographie ermittelt¹¹⁷ und liegt in der *SWISS-Model* Datenbank für Strukturvergleiche bereit (Abbildung 20).

SWISS-MODEL

Modeling Repository Documentation Log in Create Account

SMTL id 3la.1 |

Title Interconversion of Human Lysosomal Enzyme Specificities

Method X-RAY DIFFRACTION 3.04 Å

Oligo State homo-dimer

Ligands 3 x NAG¹⁵: SUGAR (N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE) *Post Translational Modification*
 2 x NAG¹⁵: NAG¹⁵: MAN¹⁵: SUGAR (4-MER) *Ligand Not Annotated*
 1 x NAG¹⁵: NAG¹⁵: SUGAR (2-MER) *Post Translational Modification*
 4 x GLA¹⁵: SUGAR (ALPHA-D-GALACTOSE) *Non-covalent*

Links RCSB¹⁷ PDBe¹⁸ PDB¹⁹ CATH²⁰

Citation Tomasic, I.B. et al., Interconversion of the specificities of human lysosomal enzymes associated with Fabry and Schindler diseases. J Biol Chem. (2010) [10.1074/jbc.M110.000000](#)

Peptides Alpha-galactosidase A, A1, B1

SMTL_PDB SMTL Chain Id: A, B
PDB Chain Id: A, B

Alpha-galactosidase A

Sequences: 3laa.1, 3laa.1.A, 3laa.1.B, 3laa.1.C, 3laa.1.D, 3laa.1.E, 3laa.1.F, 3laa.1.G, 3laa.1.H, 3laa.1.I, 3laa.1.J, 3laa.1.K, 3laa.1.L, 3laa.1.M, 3laa.1.N, 3laa.1.O, 3laa.1.P, 3laa.1.Q, 3laa.1.R, 3laa.1.S, 3laa.1.T, 3laa.1.U, 3laa.1.V, 3laa.1.W, 3laa.1.X, 3laa.1.Y, 3laa.1.Z, 3laa.1.aa, 3laa.1.ab, 3laa.1.ac, 3laa.1.ad, 3laa.1.ae, 3laa.1.af, 3laa.1.ag, 3laa.1.ah, 3laa.1.ai, 3laa.1.aj, 3laa.1.ak, 3laa.1.al, 3laa.1.am, 3laa.1.an, 3laa.1.ao, 3laa.1.ap, 3laa.1.aq, 3laa.1.ar, 3laa.1.as, 3laa.1.at, 3laa.1.au, 3laa.1.av, 3laa.1.aw, 3laa.1.ax, 3laa.1.ay, 3laa.1.az, 3laa.1.ba, 3laa.1.bb, 3laa.1.bc, 3laa.1.bd, 3laa.1.be, 3laa.1 bf, 3laa.1.bg, 3laa.1.bh, 3laa.1.bi, 3laa.1.bj, 3laa.1.bk, 3laa.1.bl, 3laa.1 bm, 3laa.1.bn, 3laa.1.bo, 3laa.1.bp, 3laa.1.bq, 3laa.1.br, 3laa.1.bs, 3laa.1.bt, 3laa.1.bu, 3laa.1.bv, 3laa.1.bw, 3laa.1.bx, 3laa.1.by, 3laa.1.bz, 3laa.1.ca, 3laa.1.cb, 3laa.1.cc, 3laa.1.cd, 3laa.1.ce, 3laa.1.cf, 3laa.1.cg, 3laa.1.ch, 3laa.1.ci, 3laa.1.cj, 3laa.1 ck, 3laa.1.cl, 3laa.1.cm, 3laa.1.cn, 3laa.1.co, 3laa.1.cp, 3laa.1.cq, 3laa.1.cr, 3laa.1.cs, 3laa.1.ct, 3laa.1.cu, 3laa.1.cv, 3laa.1.cw, 3laa.1.cx, 3laa.1.cy, 3laa.1.cz, 3laa.1.da, 3laa.1.db, 3laa.1.dc, 3laa.1.dd, 3laa.1.de, 3laa.1.df, 3laa.1.dg, 3laa.1.dh, 3laa.1.di, 3laa.1.dj, 3laa.1.dk, 3laa.1.dl, 3laa.1.dm, 3laa.1.dn, 3laa.1.do, 3laa.1.dp, 3laa.1.dq, 3laa.1.dr, 3laa.1.ds, 3laa.1.dt, 3laa.1.du, 3laa.1.dv, 3laa.1.dw, 3laa.1.dx, 3laa.1.dy, 3laa.1.dz, 3laa.1.ea, 3laa.1 eb, 3laa.1.ec, 3laa.1.ed, 3laa.1.ee, 3laa.1.ef, 3laa.1.eg, 3laa.1.eh, 3laa.1.ei, 3laa.1.ej, 3laa.1.ek, 3laa.1.el, 3laa.1.em, 3laa.1.en, 3laa.1.eo, 3laa.1.ep, 3laa.1.eq, 3laa.1.er, 3laa.1.es, 3laa.1.et, 3laa.1.eu, 3laa.1.ev, 3laa.1.ew, 3laa.1.ex, 3laa.1.ey, 3laa.1.ez, 3laa.1.fa, 3laa.1.fb, 3laa.1.fc, 3laa.1.fd, 3laa.1.fe, 3laa.1.ff, 3laa.1.fg, 3laa.1.fh, 3laa.1.fi, 3laa.1.fj, 3laa.1.fk, 3laa.1.fl, 3laa.1.fm, 3laa.1.fn, 3laa.1.fo, 3laa.1.fp, 3laa.1.fq, 3laa.1.fr, 3laa.1.fs, 3laa.1.ft, 3laa.1.fu, 3laa.1.fv, 3laa.1.fw, 3laa.1.fx, 3laa.1.fy, 3laa.1.fz, 3laa.1.ga, 3laa.1.gb, 3laa.1.gc, 3laa.1.gd, 3laa.1.ge, 3laa.1.gf, 3laa.1.gg, 3laa.1.gh, 3laa.1.gi, 3laa.1.gj, 3laa.1.gk, 3laa.1.gl, 3laa.1.gm, 3laa.1.gn, 3laa.1.go, 3laa.1.gp, 3laa.1.gq, 3laa.1.gr, 3laa.1.gs, 3laa.1.gt, 3laa.1.gu, 3laa.1.gv, 3laa.1.gw, 3laa.1.gx, 3laa.1.gy, 3laa.1.gz, 3laa.1.ha, 3laa.1.hb, 3laa.1.hc, 3laa.1.hd, 3laa.1.he, 3laa.1.hf, 3laa.1.hg, 3laa.1.hh, 3laa.1.hi, 3laa.1.hj, 3laa.1.hk, 3laa.1.hl, 3laa.1.hm, 3laa.1.hn, 3laa.1.ho, 3laa.1.hp, 3laa.1.hq, 3laa.1.hr, 3laa.1.hs, 3laa.1.ht, 3laa.1.hu, 3laa.1.hv, 3laa.1.hw, 3laa.1.hx, 3laa.1.hy, 3laa.1.hz, 3laa.1.ia, 3laa.1.ib, 3laa.1.ic, 3laa.1.id, 3laa.1.ie, 3laa.1.if, 3laa.1.ig, 3laa.1.ih, 3laa.1.ii, 3laa.1.ij, 3laa.1.ik, 3laa.1.il, 3laa.1.im, 3laa.1.in, 3laa.1.io, 3laa.1.ip, 3laa.1.iq, 3laa.1.ir, 3laa.1.is, 3laa.1.it, 3laa.1.iu, 3laa.1.iv, 3laa.1.iw, 3laa.1.ix, 3laa.1.iy, 3laa.1.iz, 3laa.1.ja, 3laa.1.jb, 3laa.1.jc, 3laa.1.jd, 3laa.1.je, 3laa.1.jf, 3laa.1.jg, 3laa.1.jh, 3laa.1.ji, 3laa.1.jj, 3laa.1.jk, 3laa.1.jl, 3laa.1.jm, 3laa.1.jn, 3laa.1.jo, 3laa.1.jp, 3laa.1.jq, 3laa.1.jr, 3laa.1.js, 3laa.1.jt, 3laa.1.ju, 3laa.1.jv, 3laa.1.jw, 3laa.1.jx, 3laa.1.jy, 3laa.1.jz, 3laa.1.ka, 3laa.1.kb, 3laa.1.kc, 3laa.1.kd, 3laa.1.ke, 3laa.1.kf, 3laa.1.kg, 3laa.1.kh, 3laa.1.ki, 3laa.1.kj, 3laa.1.kk, 3laa.1.kl, 3laa.1.km, 3laa.1.kn, 3laa.1.ko, 3laa.1.kp, 3laa.1.kq, 3laa.1.kr, 3laa.1.ks, 3laa.1.kt, 3laa.1.ku, 3laa.1.kv, 3laa.1.kw, 3laa.1.kx, 3laa.1.ky, 3laa.1.kz, 3laa.1.la, 3laa.1.lb, 3laa.1.lc, 3laa.1.ld, 3laa.1.le, 3laa.1.lf, 3laa.1.lg, 3laa.1.lh, 3laa.1.li, 3laa.1.lj, 3laa.1.lk, 3laa.1.ll, 3laa.1.lm, 3laa.1.ln, 3laa.1.lo, 3laa.1.lp, 3laa.1.lq, 3laa.1.lr, 3laa.1.ls, 3laa.1.lt, 3laa.1.lu, 3laa.1.lv, 3laa.1.lw, 3laa.1.lx, 3laa.1.ly, 3laa.1.lz, 3laa.1.ma, 3laa.1.mb, 3laa.1.mc, 3laa.1.md, 3laa.1.me, 3laa.1.mf, 3laa.1.mg, 3laa.1.mh, 3laa.1.mi, 3laa.1.mj, 3laa.1.mk, 3laa.1.ml, 3laa.1.mm, 3laa.1.mn, 3laa.1.mo, 3laa.1.mp, 3laa.1.mq, 3laa.1.mr, 3laa.1.ms, 3laa.1.mt, 3laa.1.mu, 3laa.1.mv, 3laa.1.mw, 3laa.1.mx, 3laa.1.my, 3laa.1.mz, 3laa.1.na, 3laa.1.nb, 3laa.1.nc, 3laa.1.nd, 3laa.1.ne, 3laa.1.nf, 3laa.1.ng, 3laa.1.nh, 3laa.1.ni, 3laa.1.nj, 3laa.1.nk, 3laa.1.nl, 3laa.1.nm, 3laa.1.nn, 3laa.1.no, 3laa.1.np, 3laa.1.nq, 3laa.1.nr, 3laa.1.ns, 3laa.1.nt, 3laa.1.nu, 3laa.1.nv, 3laa.1.nw, 3laa.1.nx, 3laa.1.ny, 3laa.1.nz, 3laa.1.oe, 3laa.1.of, 3laa.1.og, 3laa.1.oh, 3laa.1.oi, 3laa.1.oj, 3laa.1.ok, 3laa.1.ol, 3laa.1.om, 3laa.1.on, 3laa.1.oo, 3laa.1.op, 3laa.1.oq, 3laa.1.or, 3laa.1.os, 3laa.1.ot, 3laa.1.ou, 3laa.1.ov, 3laa.1.ow, 3laa.1.ox, 3laa.1.oy, 3laa.1.oz, 3laa.1.pa, 3laa.1.pb, 3laa.1.pc, 3laa.1.pd, 3laa.1.pe, 3laa.1.pf, 3laa.1.pg, 3laa.1.ph, 3laa.1.pi, 3laa.1.pj, 3laa.1.pk, 3laa.1.pl, 3laa.1.pm, 3laa.1.pn, 3laa.1.po, 3laa.1.pp, 3laa.1.pq, 3laa.1.pr, 3laa.1.ps, 3laa.1.pt, 3laa.1.pu, 3laa.1.pv, 3laa.1.pw, 3laa.1.px, 3laa.1.py, 3laa.1.pz, 3laa.1.qa, 3laa.1.qb, 3laa.1.qc, 3laa.1.qd, 3laa.1.qe, 3laa.1.qf, 3laa.1.qg, 3laa.1.qh, 3laa.1.qi, 3laa.1.qj, 3laa.1.qk, 3laa.1 ql, 3laa.1.qm, 3laa.1.qn, 3laa.1.qo, 3laa.1.qp, 3laa.1.qq, 3laa.1.qr, 3laa.1.qs, 3laa.1.qt, 3laa.1.qu, 3laa.1.qv, 3laa.1.qw, 3laa.1.qx, 3laa.1.qy, 3laa.1.qz, 3laa.1.ra, 3laa.1.rb, 3laa.1.rc, 3laa.1.rd, 3laa.1.re, 3laa.1.rf, 3laa.1.rg, 3laa.1.rh, 3laa.1.ri, 3laa.1.rj, 3laa.1.rk, 3laa.1.rl, 3laa.1.rm, 3laa.1.rn, 3laa.1.ro, 3laa.1.rp, 3laa.1.rq, 3laa.1.rr, 3laa.1.rs, 3laa.1.rt, 3laa.1.ru, 3laa.1.rv, 3laa.1.rw, 3laa.1.rx, 3laa.1.ry, 3laa.1.rz, 3laa.1.sa, 3laa.1.sb, 3laa.1.sc, 3laa.1.sd, 3laa.1.se, 3laa.1.sf, 3laa.1.sg, 3laa.1.sh, 3laa.1.si, 3laa.1.sj, 3laa.1.sk, 3laa.1.sl, 3laa.1.sm, 3laa.1.sn, 3laa.1.so, 3laa.1.sp, 3laa.1.sq, 3laa.1.sr, 3laa.1.ss, 3laa.1.st, 3laa.1.su, 3laa.1.sv, 3laa.1.sw, 3laa.1.sx, 3laa.1.sy, 3laa.1.sz, 3laa.1.ta, 3laa.1.tb, 3laa.1.tc, 3laa.1.td, 3laa.1.te, 3laa.1.tf, 3laa.1.tg, 3laa.1.th, 3laa.1.ti, 3laa.1.tj, 3laa.1.tk, 3laa.1.tl, 3laa.1.tm, 3laa.1.tn, 3laa.1.to, 3laa.1.tp, 3laa.1.tq, 3laa.1.tr, 3laa.1.ts, 3laa.1.tt, 3laa.1.tu, 3laa.1.tv, 3laa.1.tw, 3laa.1.tx, 3laa.1.ty, 3laa.1.tz, 3laa.1.ua, 3laa.1.ub, 3laa.1.uc, 3laa.1.ud, 3laa.1.ue, 3laa.1.uf, 3laa.1.ug, 3laa.1.uh, 3laa.1.ui, 3laa.1.uj, 3laa.1.uk, 3laa.1.ul, 3laa.1.um, 3laa.1.un, 3laa.1.uo, 3laa.1.up, 3laa.1.uq, 3laa.1.ur, 3laa.1.us, 3laa.1.ut, 3laa.1.uv, 3laa.1.uw, 3laa.1.ux, 3laa.1.uy, 3laa.1.uz, 3laa.1.va, 3laa.1.vb, 3laa.1.vc, 3laa.1.vd, 3laa.1.ve, 3laa.1.vf, 3laa.1.vg, 3laa.1.vh, 3laa.1.vi, 3laa.1.vj, 3laa.1.vk, 3laa.1.vl, 3laa.1.vm, 3laa.1.vn, 3laa.1.vo, 3laa.1.vp, 3laa.1.vq, 3laa.1.vr, 3laa.1.vs, 3laa.1.vt, 3laa.1.vu, 3laa.1.vv, 3laa.1.vw, 3laa.1.vx, 3laa.1.vy, 3laa.1.vz, 3laa.1.wa, 3laa.1.wb, 3laa.1.wc, 3laa.1.wd, 3laa.1.we, 3laa.1.wf, 3laa.1.wg, 3laa.1.wh, 3laa.1.wi, 3laa.1.wj, 3laa.1.wk, 3laa.1.wl, 3laa.1.wm, 3laa.1.wn, 3laa.1.wo, 3laa.1.wp, 3laa.1.wq, 3laa.1.wr, 3laa.1.ws, 3laa.1.wt, 3laa.1.wu, 3laa.1.wv, 3laa.1.wx, 3laa.1.wy, 3laa.1.wz, 3laa.1.xa, 3laa.1.xb, 3laa.1.xc, 3laa.1.xd, 3laa.1.xe, 3laa.1.xf, 3laa.1.xg, 3laa.1.xh, 3laa.1.xi, 3laa.1.xj, 3laa.1.xk, 3laa.1.xl, 3laa.1.xm, 3laa.1.xn, 3laa.1.xo, 3laa.1.xp, 3laa.1.xq, 3laa.1.xr, 3laa.1.xs, 3laa.1.xt, 3laa.1.xu, 3laa.1.xv, 3laa.1.xw, 3laa.1.xx, 3laa.1.xy, 3laa.1.xz, 3laa.1.ya, 3laa.1.yb, 3laa.1.yc, 3laa.1.yd, 3laa.1.ye, 3laa.1.yf, 3laa.1.yg, 3laa.1.yh, 3laa.1.yi, 3laa.1.yj, 3laa.1.yk, 3laa.1.yl, 3laa.1.ym, 3laa.1.yn, 3laa.1.yo, 3laa.1.yp, 3laa.1.yq, 3laa.1.yr, 3laa.1.ys, 3laa.1.yt, 3laa.1.yu, 3laa.1.yv, 3laa.1.yw, 3laa.1.yx, 3laa.1.yy, 3laa.1.yz, 3laa.1.za, 3laa.1.zb, 3laa.1.zc, 3laa.1.zd, 3laa.1.ze, 3laa.1.zf, 3laa.1.zg, 3laa.1.zh, 3laa.1.zi, 3laa.1.zj, 3laa.1.zk, 3laa.1.zl, 3laa.1.zm, 3laa.1.zn, 3laa.1.zo, 3laa.1.zp, 3laa.1.zq, 3laa.1.zr, 3laa.1.zs, 3laa.1.zt, 3laa.1.zu, 3laa.1.zv, 3laa.1.zw, 3laa.1.zx, 3laa.1.zy, 3laa.1.zz

Related Entries With Identical Sequence
 3laa.1 | 3laa.1 | 3laa.1




Abbildung 20 SWISS-Model Schablone: humane α GLA.

Die humane α -Galaktosidase A ist ein Homodimer mit 2 Bindungsstellen für α -Galaktose.

Gibt man nun die Aminosäuresequenz der beiden *Drosophila*-Genprodukte in die SWISS-Model Suche ein, so sucht das Programm zuerst nach dem entsprechenden Sequenzhomolog in der Template Datenbank, und errechnet dann mithilfe dieser Schablone die wahrscheinliche dreidimensionale Struktur der Proteine.

Für das Genprodukt von CG5731 wird mit einer Sequenzhomologie von 57.56% das humane Enzym α -N-Acetylgalaktosaminidase (α NAGAL) als Schablone verwendet (Abbildung 21).

CG5731 Created: today at 10:01

Summary Templates Models

Model Results

Oligo State Homo-dimer (matching prediction)

Ligands None

QMEAN -2.40
CB -2.66
All Atoms -1.20
Solvation -1.33
Torsion -1.64

Template Seq Identity Coverage Description
 1laa.1.A 57.56% alpha-N-acetylgalactosaminidase

Model-Template Alignment

Model_01a:MIATWILLSTSTFQ...
 Model_01b:MIATWILLSTSTFQ...
 1laa.1.A:MIATWILLSTSTFQ...
 Model_01a:MIATWILLSTSTFQ...
 Model_01b:MIATWILLSTSTFQ...
 1laa.1.A:MIATWILLSTSTFQ...
 Model_01a:MIATWILLSTSTFQ...
 Model_01b:MIATWILLSTSTFQ...
 1laa.1.A:MIATWILLSTSTFQ...
 Model_01a:MIATWILLSTSTFQ...
 Model_01b:MIATWILLSTSTFQ...
 1laa.1.A:MIATWILLSTSTFQ...

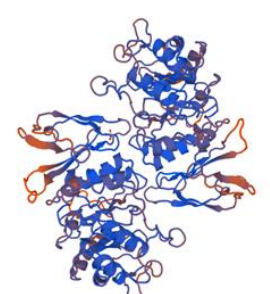


Abbildung 21 SWISS-Model Suche für CG5731

Das Programm SWISS-Model nutzt das humane Enzym α NAGAL als Schablone für die dreidimensionale Struktur von CG5731.

Für das Genprodukt von CG7997 wird mit einer Sequenzhomologie von 49,08% das Enzym α Galaktosidase A als Schablone verwendet (Abbildung 22).

Laut SWISS-Model ist CG7997 ein Homodimer, welches der humanen α -

Galaktosidase A auch in seinem aktiven Zentrum ähnelt. Es werden 2 Bindungsstellen für α -Galaktose vorausgesagt.



Abbildung 22 SWISS-Model Suche für CG7997

Das Programm SWISS-Model nutzt das humane Enzym α GAL als Schablone für die dreidimensionale Struktur von CG7997.

Legt man nun alle verwendeten Schablonen und vorhergesagten Modelle übereinander, so fällt sofort die große Ähnlichkeit der Strukturen auf. (Abbildung 23)

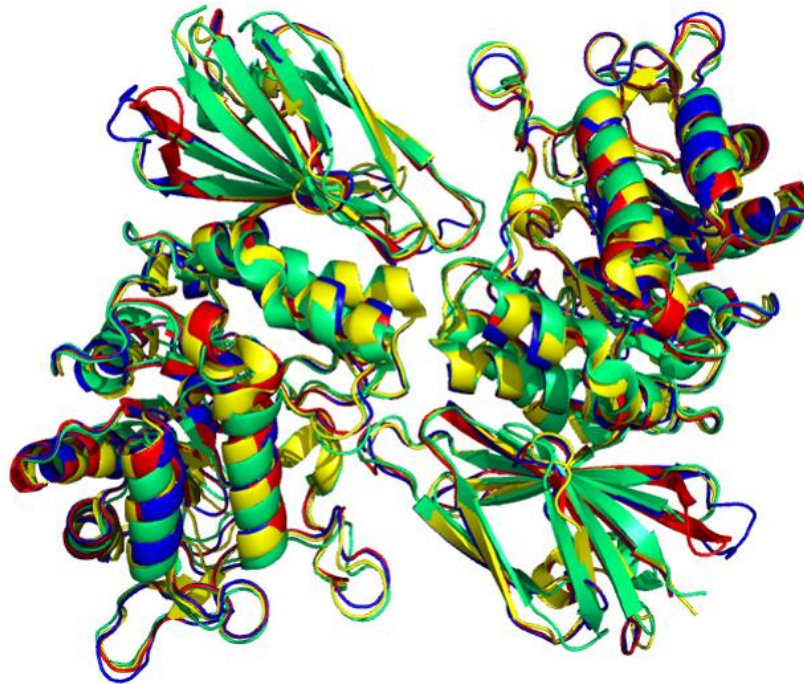


Abbildung 23 Schablonen (grün und gelb) und Modelle (blau und rot) übereinandergelegt.

Die dreidimensionale Struktur der beiden humanen Enzyme α GAL und α NAGAL sowie die putativen Modelle der Fliegenenzyme CG5731 und CG7997 sind sich sehr ähnlich. α GAL (grün), α NAGAL (gelb), CG7997 (blau) und CG5731 (rot); Erstellt mit: SWISS-Model.

Die humanen Enzyme α NAGAL und α GAL haben evolutionär den gleichen Genvorläufer¹¹⁸. Sie haben eine Sequenzhomologie von 49% und gleichen sich in ihrem katalytischen Mechanismus¹¹⁷.

Bei näherer Betrachtung des aktiven Zentrums unterscheidet sich die Substratspezifität der beiden humanen Enzyme jedoch. In Abbildung 24 ist ein Vergleich der aktiven Zentren von α GAL und α NAGAL zusammen mit dem Substrat N-Acetyl-D-Galaktosamin dargestellt. Es fällt auf, dass die Aminosäure Serin188 in α NAGAL bei α GAL durch ein Glutamin (203) ersetzt ist. Daraus ergibt sich eine sterische Hinderung für die N-acetylierte Form von α -Galaktose (Abbildung 24 *). In das aktive Zentrum von α NAGAL passen also sowohl α Gal als auch α GalNAc, wohingegen α GAL spezifisch die hydrolytische Abspaltung von α Gal Resten katalysiert¹¹⁹.

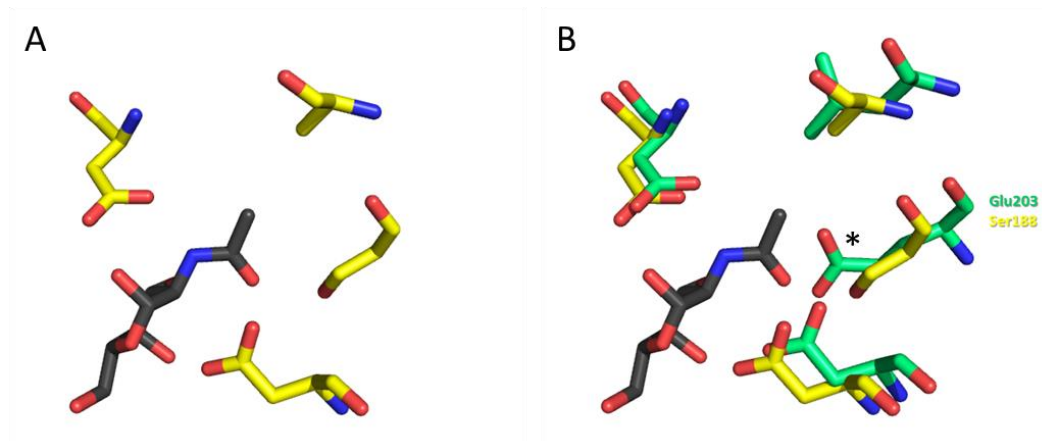


Abbildung 24 Vergleich der aktiven Zentren der beiden humanen Enzyme.

Die aktiven Zentren der humanen Enzyme αGAL und αNAGAL ähneln sich in ihrer Konformation, jedoch ist αGAL spezifischer für Galaktosereste und hat eine sterische Hinderung für deren N-acetylierte Form. (A) αNAGAL (gelb) und (B) αGLA (grün) mit dem Substrat N-Acetyl-D-Galaktosamin (schwarz). Die sterische Hinderung des Acetylrests im aktiven Zentrum von αGLA ist mit einem Stern (*) markiert.

Legt man nun über die Modelle dieser aktiven Zentren auch noch die beiden aktiven Zentren der Fliegenenzyme, so ergibt sich folgendes Bild (Abbildung 25).

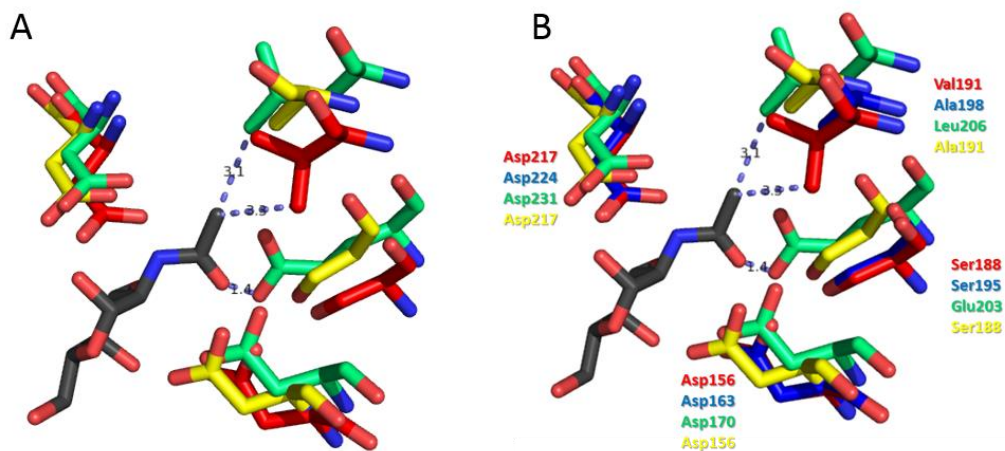


Abbildung 25 Vergleich der aktiven Zentren der humanen Enzyme und ihrer Drosophila Homologe

Wo in der humanen αGAL eine sterische Hinderung für die N-acetylierte Form von Galaktoseresten liegt, haben die beiden Drosophilahomologe CG5731 und CG7997 eine eher weite Bindungstasche, die eher der Konformation der humanen αNAGAL ähnelt. (A) αGLA (grün), αNAGAL (gelb), CG5731 (rot) und (B) CG7997 (blau).

Aus Abbildung 25 B geht hervor, dass in den beiden Fliegenenzymen keine sterischen Hinderungen für die acetylierte Form der α-Galaktose vorhanden sind. Beide haben relativ offene Bindungstaschen und können vermutlich beide Substrate umsetzen.

Da aus bioinformatischer Sicht beide *Drosophila* Enzyme die Hydrolyse von α -Galaktose karalisieren können, wurden Knockout- und RNAi-Knockdownstämme von beiden Genen bestellt und experimentell weiter charakterisiert.

1.2. Auswahl von stabilen *Drosophila* Linien

Ein großer Vorteil eines *Drosophila melanogaster* Tierversuchsmodells ist, dass viele transgene Fliegenstämme im Internet kommerziell erhältlich sind. Auf der Datenbank FlyBase sind alle erhältlichen Linien verschiedener Institutionen nach Genotyp sortiert zusammengefasst (Abbildung 26). Es werden dabei sowohl UAS-RNAi Stämme aufgelistet, als auch Fliegenlinien, die in dem gesuchten Gen eine Transposoninsertion haben. Diese Linien sind nicht weiter in ihren Eigenschaften charakterisiert, so dass vor Beginn der eigentlichen Forschungsarbeit ein funktioneller Knockoutnachweis nötig ist.

A			
✓	#Collection↑	↓Stock No.↑	↓Genotype↑
✓	1 Bloomington Drosophila Stock Center	16032	y[1] w[1118]; PBac{w(+mC)=5HPw(+)}CG5731{A076}
✓	2 Vienna Drosophila Resource Center	v15543	w[1118]; P{GD5371}v15543
✓	3 Vienna Drosophila Resource Center	v16936	w[1118]; P{GD5371}v16936
✓	4 FlyORF	F003544	M{UAS-CG5731_ORF_3xHA_GW}ZH-86Fb
✓	5 Exelixis at Harvard Medical School	-	PBac{PB}CG5731{c04074}
✓	6 Exelixis at Harvard Medical School	-	P{XP}CG5731{d10798}
✓	7 Exelixis at Harvard Medical School	-	PBac{WH}CG5731{f00094}
✓	8 Exelixis at Harvard Medical School	-	PBac{WH}CG5731{f06281}
B			
✓	#Collection↑	↓Stock No.↑	↓Genotype↑
✓	1 Bloomington Drosophila Stock Center	21933	w[1118]; P{w(+mC)=EPg}CG7997{HP21752}
✓	2 Bloomington Drosophila Stock Center	41425	y[1] w[*]; Mi{y(+mDint2)=MIC}CG7997{MI05592}
✓	3 Bloomington Drosophila Stock Center	57781	y[1] sc[*] v[1]; P{y(+t7.7) v(+t1.8)=TRiP.HMCO4975}attP40
✓	4 Bloomington Drosophila Stock Center	57906	y[1] w[*]; Mi{y(+mDint2)=MIC}CG7997{MI12253}
✓	5 Bloomington Drosophila Stock Center	63655	y[1] v[1]; P{y(+t7.7) v(+t1.8)=TRiP.HMJ30222}attP40
✓	6 Bloomington Drosophila Stock Center	63755	w[1118]; PBac{w(+mC)=IT.GAL4}CG7997{0714-G4}
✓	7 Vienna Drosophila Resource Center	v16840	w[1118]; P{GD5827}v16840

Abbildung 26 Flybase – kommerziell erhältliche Fliegenstämme.

(A) CG5731, bestellte „Knockout“ Stämme sind farbig umrandet, bestellte RNAi-Stämme sind farbig hinterlegt. (B) CG7997, bestellte „Knockout“ Stämme sind farbig umrandet, bestellte RNAi-Stämme sind farbig hinterlegt.

Es wurden für jedes Gen sowohl UAS-RNAi Linien, als auch putative „Knockout“ Linien bestellt. Diese werden der Einfachheit halber schon zu Beginn dieser Arbeit als „Knockoutlinien“ bezeichnet, auch wenn der Knockoutnachweis erst zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit gezeigt wird.

Für CG5731 wurde der UAS-RNAi-Stamm des *Vienna Drosophila Research Center* mit der Nummer v15543 bestellt. Außerdem wurden alle zu dem Zeitpunkt lieferbaren Knockout-Linien bestellt: Stocknummer 16032 des *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC) sowie PBac{PB}CG5731c⁰⁴⁰⁷⁴, PBac{WH}CG5731f⁰⁰⁰⁹⁴ und PBac{WH}CG5731f⁰⁶²⁸¹ der Exelis Sammlung der Harvard Medical School.

Für CG7997 wurde der einzig verfügbare Gal4-RNAi Stamm des Vienna *Drosophila* Research Center mit der Nummer v16840 bestellt, sowie die Knockout-Linie des BDSC mit der Nummer 41425.

Nun sollen diese Linien in den weiteren Versuchen auf ihre Tauglichkeit für ein Fabry *Drosophila* Modell geprüft werden.

1.3. Generierung einer kombinierten CG5731/CG7997 Knockdown Linie

Da aus bioinformatischer Sicht abzusehen war, dass beide Gene in gewissem Maße die gesuchte Reaktion katalysieren, wurde eine kombinierte CG5731/CG7997 UAS-RNAi Linie erstellt. Dabei wurde die Tatsache genutzt, dass das UAS-RNAi-Genkonstrukt von CG5731 auf dem 2. Chromosom, und das UAS-RNAi-Genkonstrukt von CG7997 auf dem 3. Chromosom verankert ist. Dies ermöglicht ein einfacheres Kreuzungsschema, das ohne Rekombination auskommt.

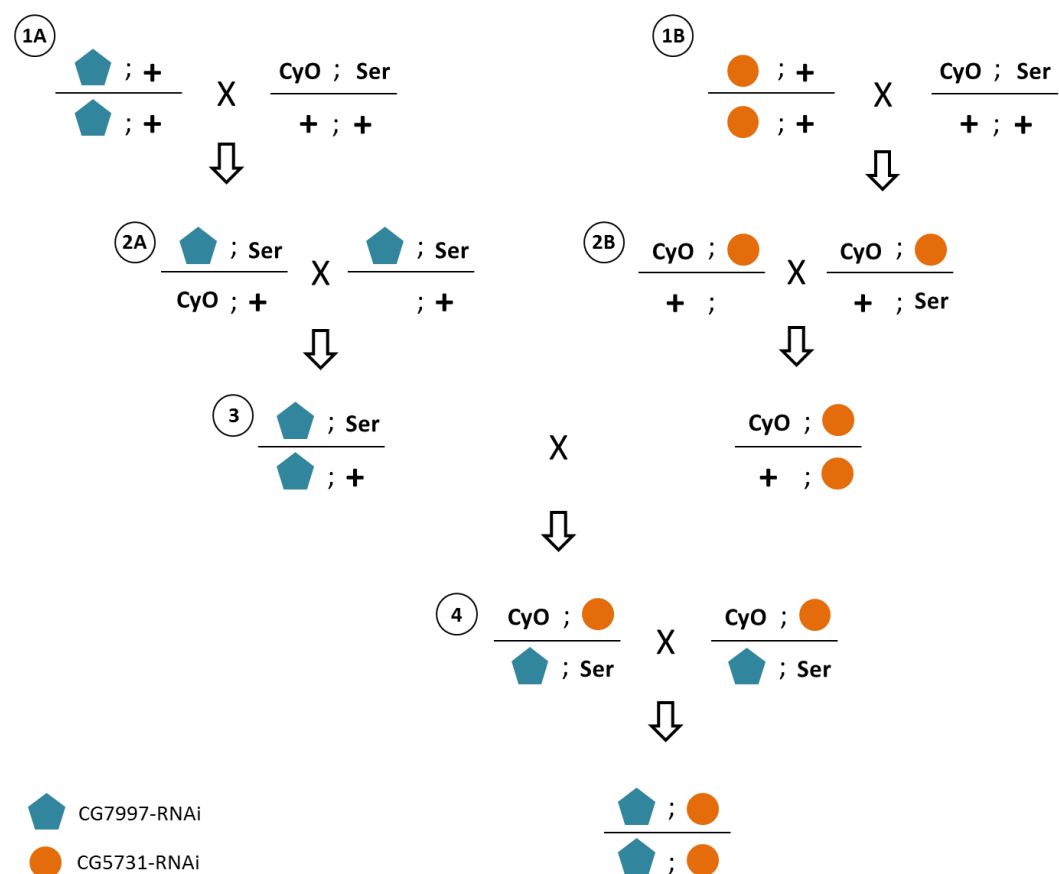


Abbildung 27 Kreuzungsschema der kombinierten CG5731/CG7997-RNAi Linie.

Als Markergene dienen die Gene „Curly“ (nach oben gebogene Flügel) und „Serrate“ (an kaudalem Ende halbmondförmig eingeschnittene Flügel). Eigene Abbildung.

Der praktische Ablauf des Kreuzungsprozesses mit den beiden Markergenen Curly und Serrate ist im Methoden Teil 2.1.5 genauer dargestellt.

2. Enzymaktivitätstest

Um zu prüfen, in welchen Fliegenstämmen tatsächlich eine funktionelle Störung der α -Galaktosidase A Aktivität vorliegt, und gleichzeitig die Übertragbarkeit der katalysierten Reaktion zwischen den Spezies zu demonstrieren, wurde ein Enzymaktivitätstest aus der humanmedizinischen Diagnostik mit den Fliegenproben etabliert und durchgeführt¹²⁰.

2.1. Etablierung des Enzymaktivitätstests für *Drosophila*

Da ein solcher Test für *Drosophila melanogaster* zuvor nicht existierte, wurde ein neues Protokoll geschaffen und dessen Durchführung etabliert.

Tendenziell erfolgte die Messung der α GLA Aktivität nach der Methode von Mayes et al.¹⁰⁹. Mit Hilfe eines synthetischen Substrats (4-Methylumbelliferyl- α -D-Galaktopyranosid), welches nach Umsetzung durch das Enzym bei Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert, kann die Enzymaktivität durch Messung dieser Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Je höher die Fluoreszenzintensität, desto mehr Substrat wurde umgesetzt, und desto mehr aktives Enzym befand sich in der Probe (Abbildung 28).

Da diese Reaktion zu einem gewissen Grad auch von dem Enzym N-Acetyl-D-Galaktosaminidase katalysiert wird, wurde dem Testpuffer N-Acetyl-D-Galaktosamin als Inhibitor dieser enzymatischen Reaktion zugesetzt. Dadurch wird eine fast vollständige Hemmung erreicht¹²¹ und die Reaktion wird nur noch von α -Galaktosidase A katalysiert.

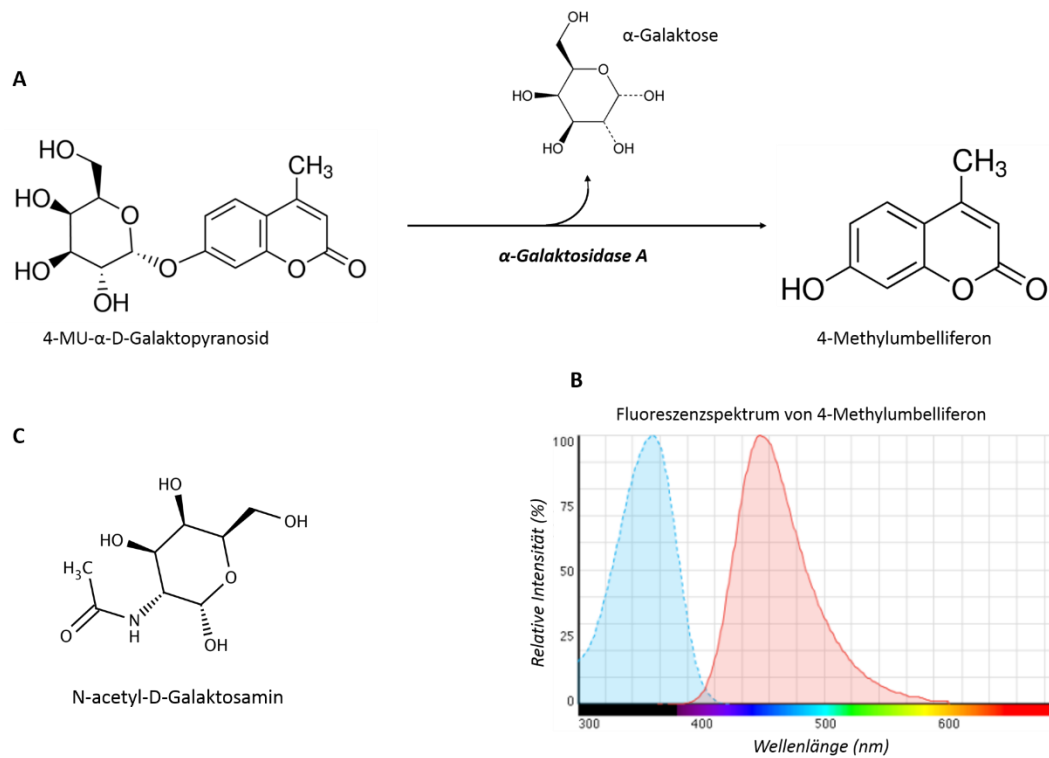


Abbildung 28 Funktionsweise des Enzymaktivitätstests.

Nach Spaltung von 4-MU- α -D-Galaktopyranosid durch das Enzym α GLA fluoresziert das Produkt (4-Methylumbelliferon) bei Anregung mit 355 nm. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die in der Probe vorhandene Menge Enzym schließen. Dem Testpuffer wird mit N-acetyl-D-Galaktosamin ein Hemmstoff für α NAGAL zugefügt, um die Spezifität des Tests zu erhöhen. (A) von α -Galaktosidase A katalysierte Reaktionsgleichung (B) Fluoreszenzspektrum von 4-Methylumbelliferon (modifiziert nach <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/spectra/images/189ph9.jpg>) (C) kompetitiver Hemmstoff der N-Acetyl-D-Galaktosaminidase (α NAGAL).

Zunächst wurden die Fluoreszenzintensitäten für eine absteigende Konzentration von α GAL bestimmt, um einen geeigneten Konzentrationsbereich für die Messung zu bestimmen. Die Kurve der Fluoreszenzaktivität im Messbereich sollte möglichst steil und fast linear ansteigen (Abbildung 29). Anschließend wurde die Menge an Fliegen in jeder Probe an diesen Bereich angepasst.

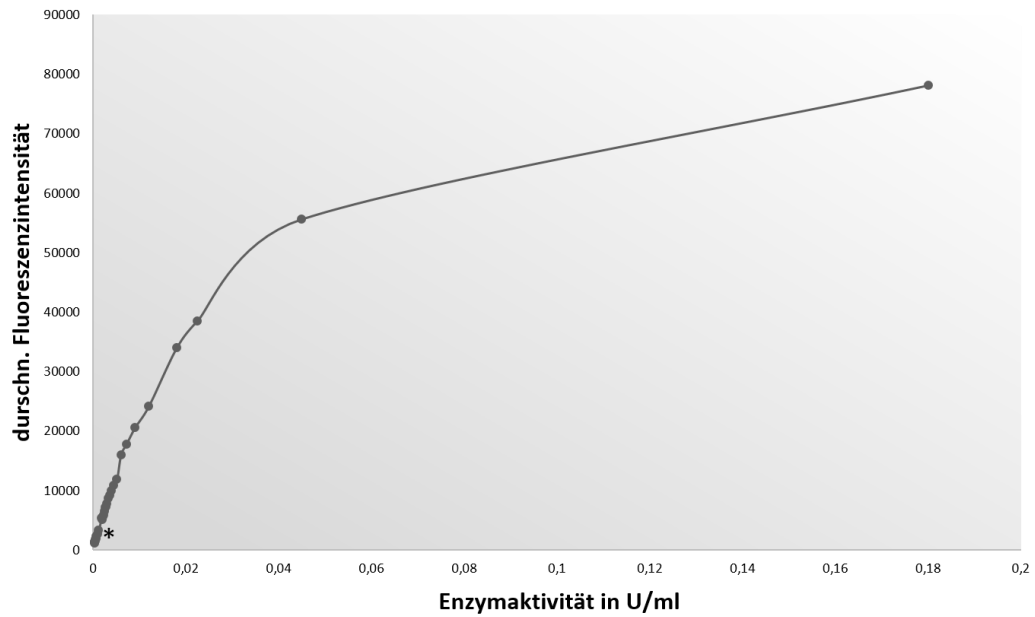


Abbildung 29 Gemessene durchschnittliche Fluoreszenzaktivität einer Standardkurve von α GAL. Der optimale Enzymkonzentrationsbereich für die Durchführung eines Enzymaktivitätstests wurde ermittelt. (*) Optimaler Bereich, da Steigung der Kurve fast linear. Grafik erstellt mit Microsoft Excel.

Die Fliegen wurden mit einem Lysepuffer und dem Precellys® System lysiert und bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, um Panzerreste zu entfernen. Da der Überstand trotz Zentrifugation nicht klar war, und der genetische Hintergrund der Fliegenlinien nicht komplett gleich ist, wurde ein probenspezifischer Blank angesetzt. Die Auswertung des Versuchs erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism.

2.2. Knockout Linien

Das Ergebnis des Screenings der beiden Knockoutlinien im Vergleich mit dem Wildtyp Berlin ist in Abbildung 30 dargestellt.

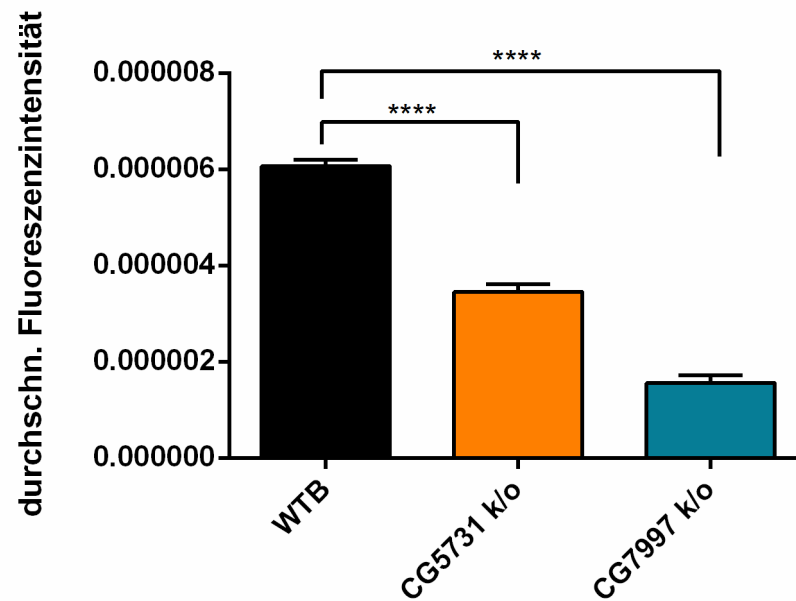


Abbildung 30 Ergebnis des Enzymaktivitätstests, Knockoutlinien und Wildtypkontrolle.

Die Enzymaktivität beider Knockoutlinien liegt signifikant unter der Kontrolle. P-Werte je <0,0001. Grafik erstellt mit dem Programm GraphPad Prism.

Die durchschnittliche Fluoreszenzaktivität der beiden Knockoutlinien ist im Vergleich zur Wildtypkontrolle deutlich reduziert. Da dem Testpuffer ein kompetitiver Hemmstoff für das Enzym α NAGAL beigefügt wurde, ist diese herabgesetzte Enzymfunktion auf den Mangel eines Enzyms mit α -Galaktosidase A Aktivität zurückzuführen.

Die CG7997-Knockoutlinie besitzt dabei eine größere Einschränkung dieser Enzymfunktion als die CG5731-Knockoutlinie. Beide Reduktionen sind im doppelten T-Test mit einem P-Wert von unter 0,0001 signifikant und der funktionelle Knockoutnachweis ist bei beiden Linien erbracht.

Eine komplette Ausschaltung der enzymatischen Katalyse wird jedoch auch in der CG7997-Knockoutlinie nicht erreicht. Da die Inkubationszeit eine Stunde beträgt, reicht auch eine geringe Menge an Enzym aus, um detektierbare Mengen des fluoreszierenden Produkts zu erzeugen.

Da für CG5731 noch weitere putative Knockoutlinien auf dem Markt erhältlich sind und ein nicht funktionierender Knockout als Ursache für die funktionelle α GLA Restaktivität ausgeschlossen werden sollte, wurden noch drei zusätzliche CG5731 Knockoutlinien auf ihre Enzymaktivität getestet (Abbildung 31).

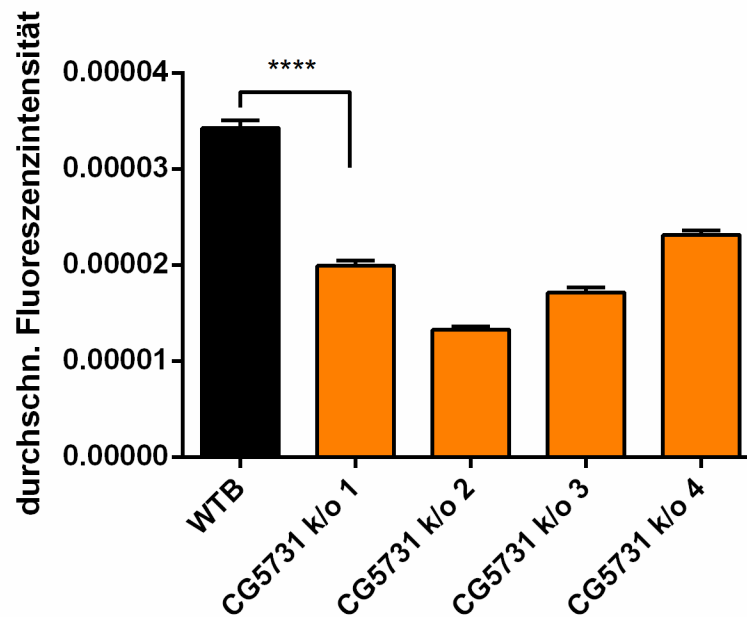


Abbildung 31 Enzymaktivitätstest der putativen CG5731 Knockoutlinien.

Die Werte liegen signifikant unter denen der Kontrolle, sind sich jedoch untereinander sehr ähnlich. Der P-Wert für CG5731 k/o 1 ist $<0,0001$. Bezeichnungen: „CG5731 k/o 1“ = $y[1] w[1118]; PBac\{w[+mC]=5HPw[+]\}CG5731[A076]$. „CG5731 k/o 2“ = $PBac\{PB\}CG5731c04074$. „CG5731 k/o 3“ = $PBac\{WH\}CG5731f00094$. „CG5731 k/o 4“ = $PBac\{WH\}CG5731f06281$. Grafik erstellt mit GraphPad Prism.

Die durchschnittliche Fluoreszenzaktivität war jedoch bei allen 4 Knockoutlinien ähnlich, daher wurde mit der ursprünglichen Knockoutlinie weitergearbeitet.

Die insgesamt unterschiedliche Höhe der Fluoreszenzintensitätswerte zwischen den Durchläufen kann möglicherweise auf das Alter der Fliegen zurückzuführen sein, da nur innerhalb eines Durchlaufes auf ein identisches Alter aller Fliegen geachtet wurde.

2.3. RNAi Linien

Um eine Expression des RNAi Konstruktes in allen Zellen der Fliege zu gewährleisten, wurden die in Kapitel 1 erwähnten UAS-RNAi-Stämme mit einem Aktin-Gal4 Treiberstamm gekreuzt und die F₁-Generation dieser Kreuzung im Enzymaktivitätstest ausgewertet. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 32 dargestellt.

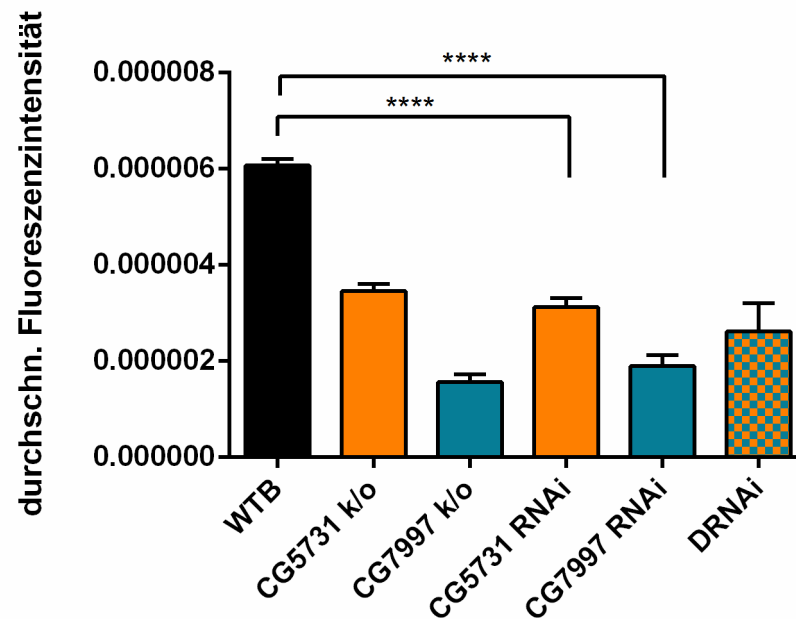


Abbildung 32 Ergebnis des Enzymaktivitätstest für die mit Aktin-Gal4 getriebenen RNAi Linien. Zu Vergleichszwecken wurden auch die Werte der Knockoutlinien in die Grafik eingefügt. Die Enzymaktivität der RNAi-Linien korreliert mit den Ergebnissen der Knockoutlinien. P-Werte des t-Tests je <0,0001. Grafik erstellt mit GraphPad Prism.

Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der beiden RNAi Linien ist deutlich reduziert und korreliert mit den respektiven Knockoutlinien. Die Werte der CG5731-RNAi-Linie sind sogar noch ein wenig geringer als die der CG5731-Knockoutlinie, die der CG7997-RNAi-Linie liegen um 0,00000015 höher als die der CG7997-Knockoutlinie. Dies ist ein verlässlicher Hinweis darauf, dass Knockout beziehungsweise Knockdown der entsprechenden Gene bei allen 4 Linien funktioniert hat.

Die Doppel RNAi Linie hat jedoch insgesamt eine höhere Fluoreszenz erzeugt als die CG7997-RNAi-Linie und liegt nur geringfügig unter der Fluoreszenz der CG5731-RNAi-Linie. Dies kann verschiedene Ursachen haben, die später in dieser Arbeit ausführlich diskutiert werden.

3. Transmissionselektronenmikroskopie

3.1 Knockout Linien

Um die Ultrastruktur der Nephrozyten zu beurteilen und die Folgen eines Knockouts bzw. Knockdowns der beiden Gene CG5731 und CG7997 für die Nephrozyten der Fliege zu charakterisieren, wurden in Kooperation mit PD Dr. Oliver Kretz transmissionselektronenmikroskopische Bilder angefertigt.

Da Morbus Fabry beim Menschen eine progressive Erkrankung ist, wurden die Nephrozyten von adulten, 14 und 28 Tage alten Fliegen untersucht. In adulten Fliegen ist es deutlich einfacher, TEM Präparate der perikardialen Nephrozyten anzufertigen, weshalb für diese Untersuchung diese Nephrozyten herangezogen wurden.

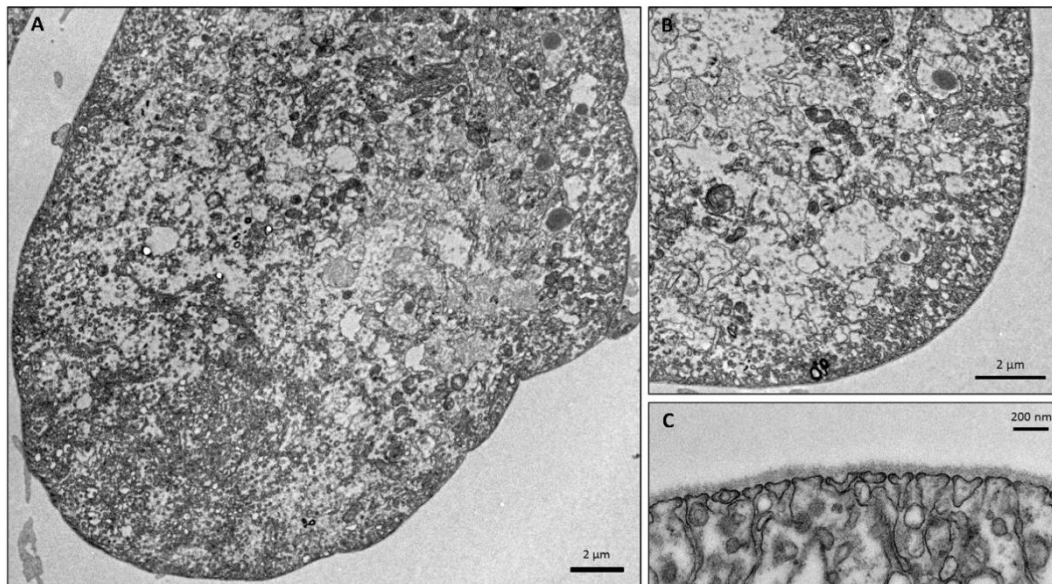


Abbildung 33 WTB d14, Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.

Am 14. Lebenstag zeigen die untersuchten Zellen der Wildtypkontrolle einen für Nephrozyten charakteristischen Aufbau mit Basalmembran, Schlitzmembranoberfläche und Lakunen. (A und B) Übersichtsaufnahmen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die erste Abbildung zeigt die Nephrozyten einer 14 Tage alten Wildtyp Fliege. In den Übersichtsaufnahmen (Abbildung 33 A und B) ist der charakteristische Aufbau dieser spezialisierten Zellen gut zu sehen. An der äußeren Oberfläche befinden sich die für Nephrozyten typischen Membraneinstülpungen, an denen der Hauptteil des Endozytoseprozesses stattfindet. Überspannt werden diese sogenannten „Lakunen“ durch die Schlitzmembran, die Filtrationsbarriere der

Nephrozyten. Die äußerste Grenze zur Hämolymphe bildet eine gleichmäßig dick ausgebildete Basalmembran (Abbildung 33 C). Im Zellinneren sind verschiedene Vesikel zu sehen, die jedoch anhand dieser Bilder nicht genauer charakterisiert werden können. Der Kern ist in dieser Schnittebene nicht sichtbar.

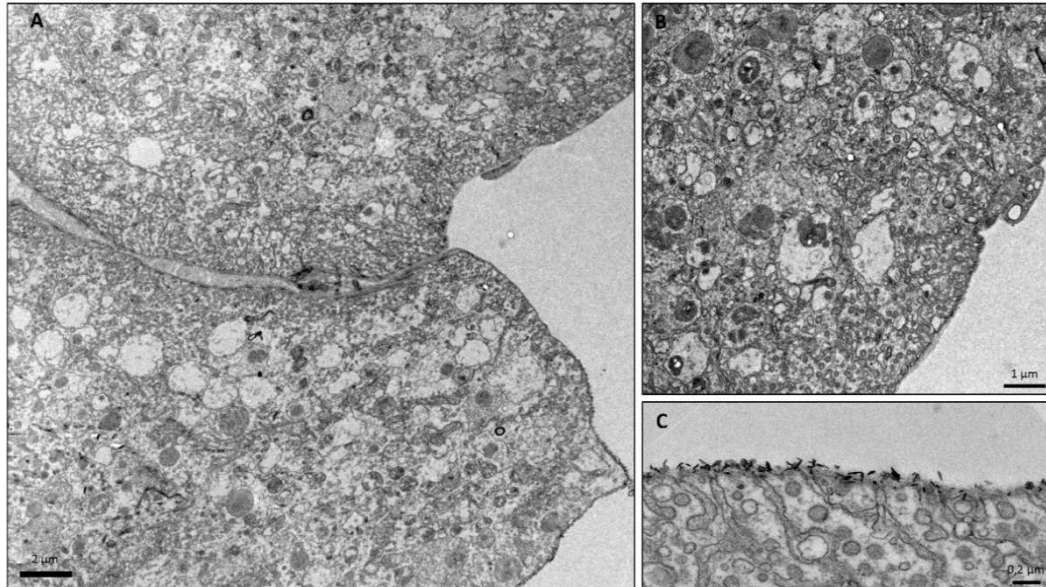


Abbildung 34 CG5731 k/o d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.

Auch die CG5731-Knockoutlinie zeigt am 14. Lebenstag einen nephrozytentypischen Aufbau. (A und B) Übersichtsaufnahmen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die nächste Abbildung (Abbildung 34) zeigt zwei benachbarte perikardiale Nephrozyten der CG5731 Knockoutlinie, auch hier wurden 14 Tage alte Fliegen präpariert. Der äußere Rand der Zelle ist hier schwerer zu beurteilen als in Abbildung 33, da sich an der Oberfläche spitze, elektronendichte Nadeln abgelagert haben (Abbildung 34 C). Vermutlich handelt es sich hierbei um Salze aus der Pufferlösung, die sich an der negativ geladenen Basalmembran niederschlagen.

An den beurteilbaren Stellen sind die Lakunen der Schlitzmembran jedoch regelmäßig angeordnet und von einer gleichmäßig dicken Basallamina überzogen. Das Zellinnere unterscheidet sich nicht von einer Wildtyp Zelle.

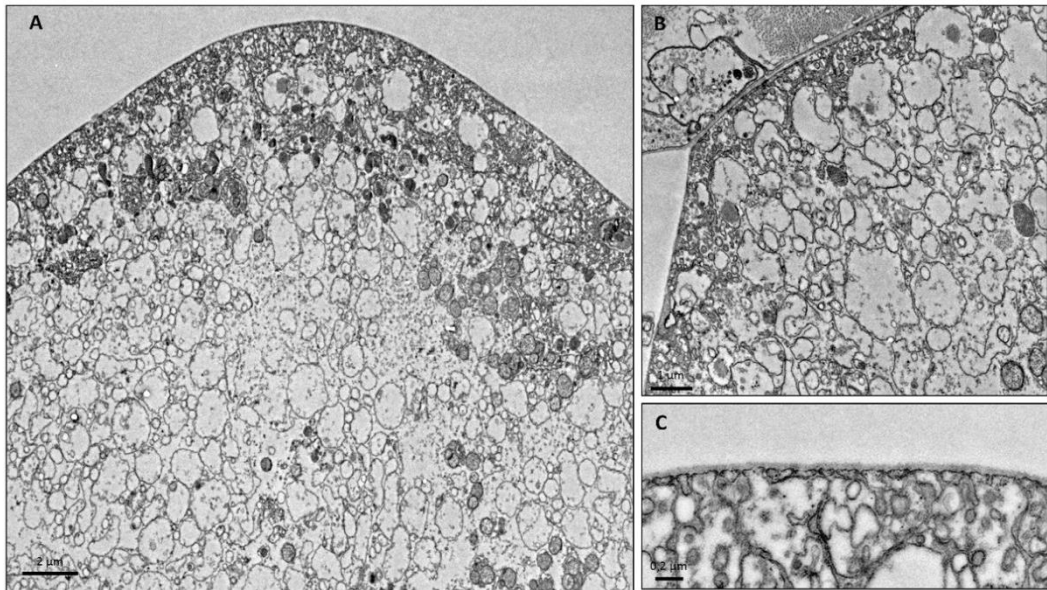


Abbildung 35 CG7997 k/o d14, Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.

Die untersuchten Nephrozyten der CG7997-Knockoutlinie sind am 14. Lebenstag deutlich geschädigt. Das Zytoplasma ist mit aufgequollenen, dünnwandigen Vesikeln angefüllt, die Zellstruktur erscheint aufgelockert und weniger dicht. (A und B) Übersichtsaufnahmen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die Abbildung 35 zeigt einen perikardialen Nephrozyten einer 14 Tage alten CG7997-Knockout-Fliege. Die äußere Oberfläche ist gut beurteilbar, die Membraneinstülpungen sind erkennbar, jedoch weniger gleichmäßig angeordnet als in der Wildtypkontrolle gleichen Alters. Die Basallamina ist gleichmäßig dick und unterscheidet sich nicht von der Wildtypkontrolle.

Das Zellinnere jedoch wirkt insgesamt weniger dicht und scheint sich aufzulösen. Die Vesikel sind besonders im Zellinneren stark aufgequollen, haben eine dünne, unregelmäßige Membran und fast keinen Inhalt. Zellorganellen wie Mitochondrien oder Golgi-Apparate sind nicht zu erkennen.

Zusammengefasst kann man am 14. Lebenstag eine deutliche Schädigung der Ultrastruktur der Nephrozyten des CG7997 Knockouts erkennen. Ein Fabry-spezifischer Phänotyp wie im Säuger, mit klassischen elektronendichten, lamellären Einschlusskörperchen ist jedoch nicht erkennbar.

Um diesen Phänotyp weiter zu charakterisieren und mehr Informationen zur Ursache dieser Veränderungen zu erhalten, wurden TEM-Aufnahmen am 28. Lebenstag aufgenommen.

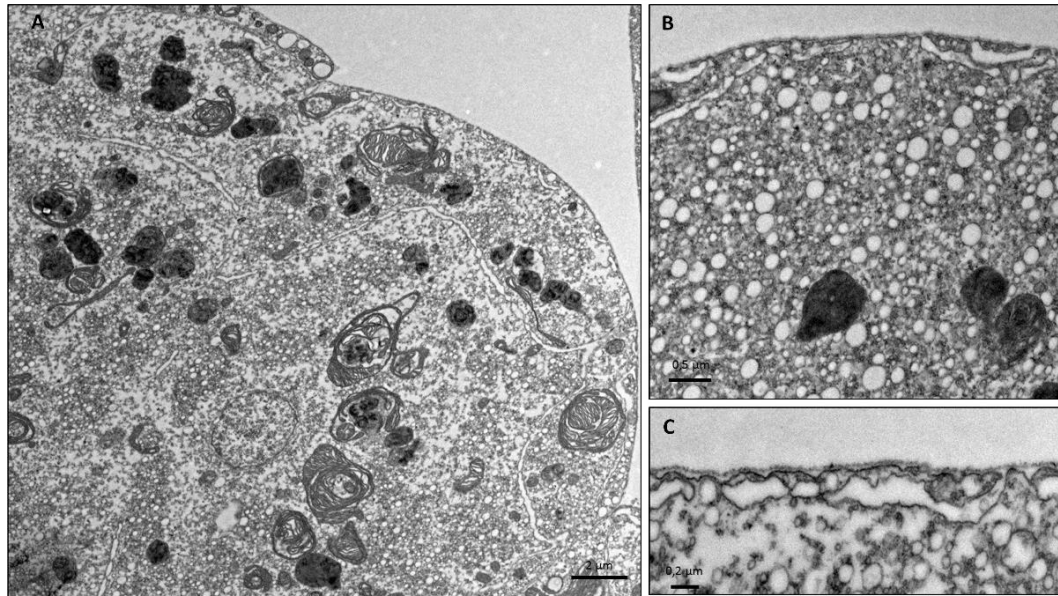


Abbildung 36 WTB d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.

Am 28. Lebenstag zeigen die Nephrozyten der Kontrolle bereits deutliche Alterungsanzeichen, die Schlitzmembran ist weniger gleichmäßig ausgeprägt. (A und B) Übersichtsaufnahmen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Am 28. Lebenstag kann man in der Wildtyp Kontrolle (Abbildung 36) deutliche Alterungsanzeichen der Nephrozyten erkennen. Die Zelloberfläche ist nicht mehr regelmäßig eingestülpt (Abbildung 36 C), die Lakunen wirken teilweise sehr flach und sind kaum noch ausgeprägt, an anderen Stellen sind sie tief, verbreitert und scheinen zu konfluieren. Im Zellinneren findet man aufgequollene Mitochondrien und mehrere dunkle, nicht weiter definierbare Vesikel.

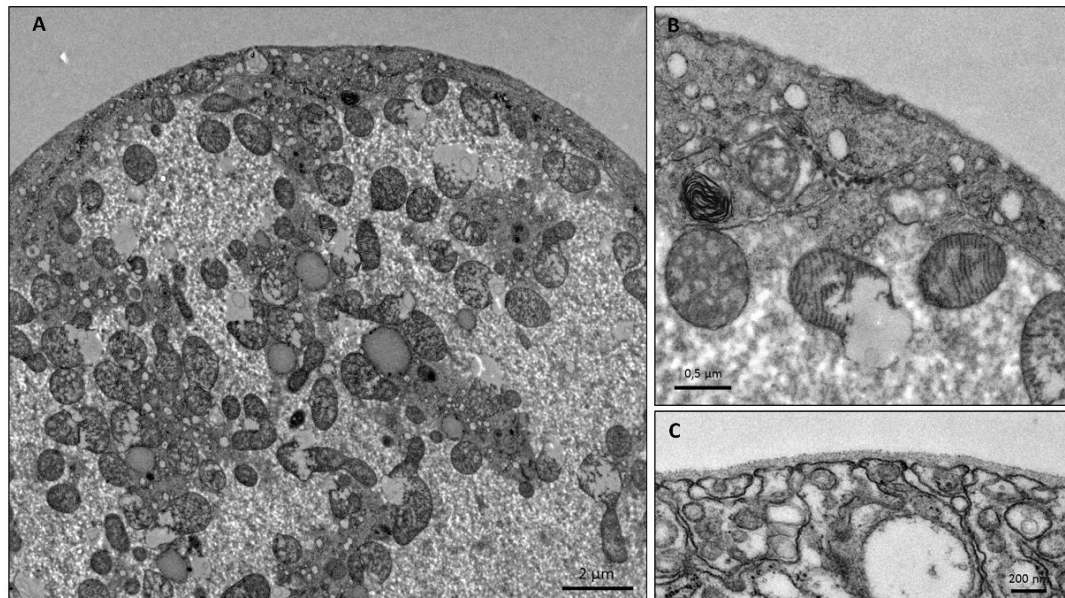


Abbildung 37 CG5731 k/o d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.

Auch in der CG5731-Knockoutlinie sind Alterserscheinungen erkennbar. Die Schlitzmembran ist nur noch an wenigen Stellen an der Zelloberfläche zu sehen. (A und B) Übersichtsaufnahmen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran

Die CG5731 Knockout Linie zeigt ähnliche Alterungserscheinungen (Abbildung 37). Auch hier sind an der Oberfläche der Zelle nur noch wenige charakteristische Schlitzmembranen zu erkennen (Abbildung 37 C). An anderen Stellen fehlen sie komplett (Abbildung 37 B). Im Zellinneren sind kaum noch Endozytosevesikel zu sehen, und auch hier wirken die Mitochondrien wie in der Wildtyp Kontrolle nicht mehr intakt.

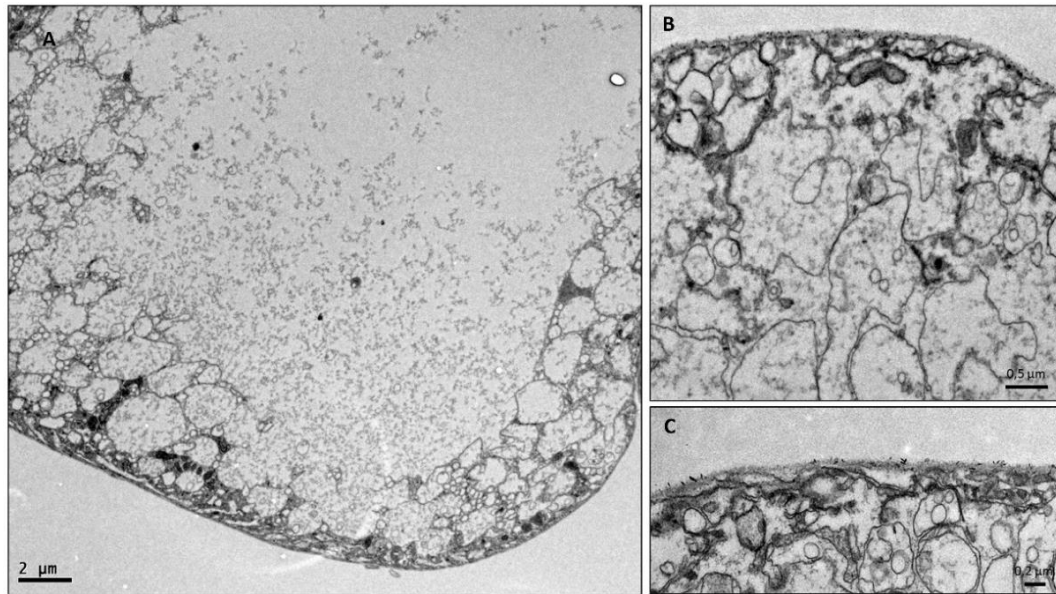


Abbildung 38 CG7997 k/o d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.

Die Nephrozyten der CG7997-Knockoutlinie sind am 28. Lebenstag kaum noch intakt. Das Zellinnere wirkt fast komplett aufgelöst. (A und B) Übersichtsaufnahmen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die schwersten Veränderungen zeigt jedoch auch am 28. Lebenstag die CG7997 Knockoutlinie. Wie in Abbildung 38 zu sehen, ist das Innere der Zelle komplett zerfallen. Nur noch am äußeren Rand sind wenige, aufgequollene und dünnwandige Vesikel erkennbar. Die charakteristische Nephrozytenoberfläche existiert nicht mehr.

Diese Zellen sind apoptotisch und daher nicht mehr für eine Phänotypcharakterisierung geeignet. Am Ende dieser Arbeit werden daher hauptsächlich die Aufnahmen des 14. Lebenstags zur Diskussion herangezogen.

3.2. RNAi – Linien

Für die Beurteilung der RNAi-Linien in der Transmissionselektronenmikroskopie wurde ein Dot-Gal4 Treiber eingesetzt, welcher die RNAi Expression in den perikardialen Nephrozyten treibt. So erhält man eine Fliege, bei der nur in den Nephrozyten ein Knockdown der beiden Gene CG5731 oder CG7997 getrieben wird. Dadurch wird die Untersuchung einer isolierten Auswirkung des Knockdowns in den Nephrozyten ohne die Einflüsse des Knockdowns im Rest des Fliegenkörpers ermöglicht. Ab welchem Zeitpunkt genau Dot-Gal4 exprimiert wird und damit die Treiberwirkung einsetzt, ist jedoch nicht genau bekannt.

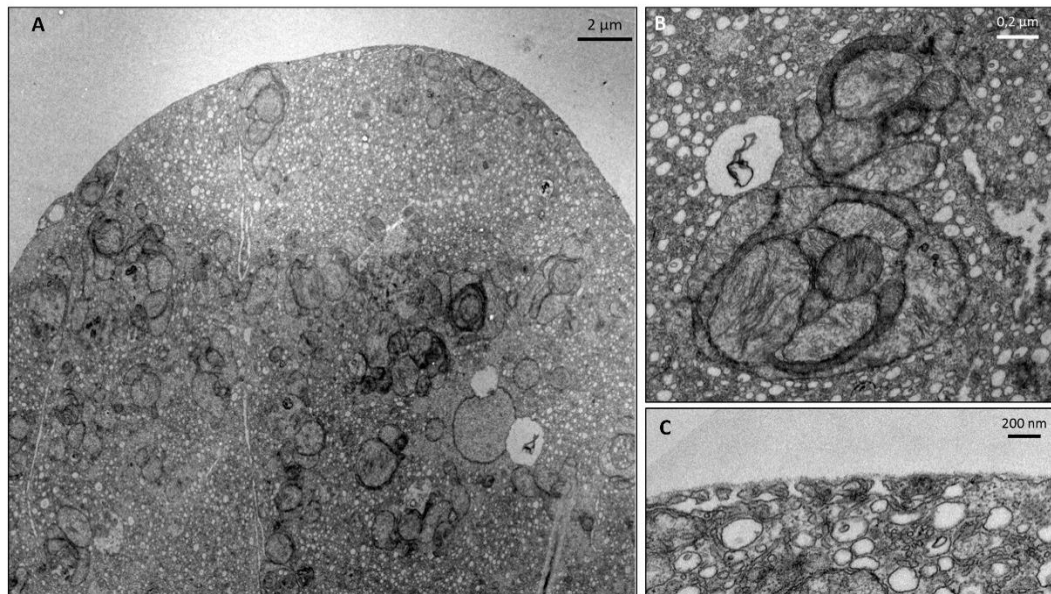


Abbildung 39 Dot-Gal4 → WTB d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.
 Die Nephrozyten des Kontrollgenotyps Dot-Gal4 → WTB sehen am 14. Lebenstag im Gegensatz zur homozygoten Wildtypkontrolle auffällig aus. Die Mitochondrien sind teilweise aufgequollen und aneinandergelagert, das Zytoplasma ist mit kleinen, leer erscheinenden Vesikeln angefüllt. (A) Übersichtsaufnahme (B) Vergrößerung der aufgequollenen Mitochondrien (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran

In Abbildung 39 ist der Kontrollgenotyp Dot-Gal4 x WTB am 14. Lebenstag zu sehen. In der Übersichtsaufnahme (Abbildung 39 A) fallen schon am 14. Lebenstag gehäuft vergrößerte, aneinandergelagerte und teilweise fusionierte Mitochondrien auf. Diese sind zur besseren Ansicht in Abbildung 39 B vergrößert dargestellt. Im Zytoplasma befinden sich unzählige sehr kleine, teils leere, teils mit elektronendichtem Inhalt gefüllte Vesikel. Die äußere Oberfläche ist gut beurteilbar, die Membraneinstülpungen sind erkennbar, jedoch weniger gleichmäßig angeordnet als in der homozygoten Wildtyp Kontrolle gleichen Alters. Die Basallamina ist gleichmäßig dick.

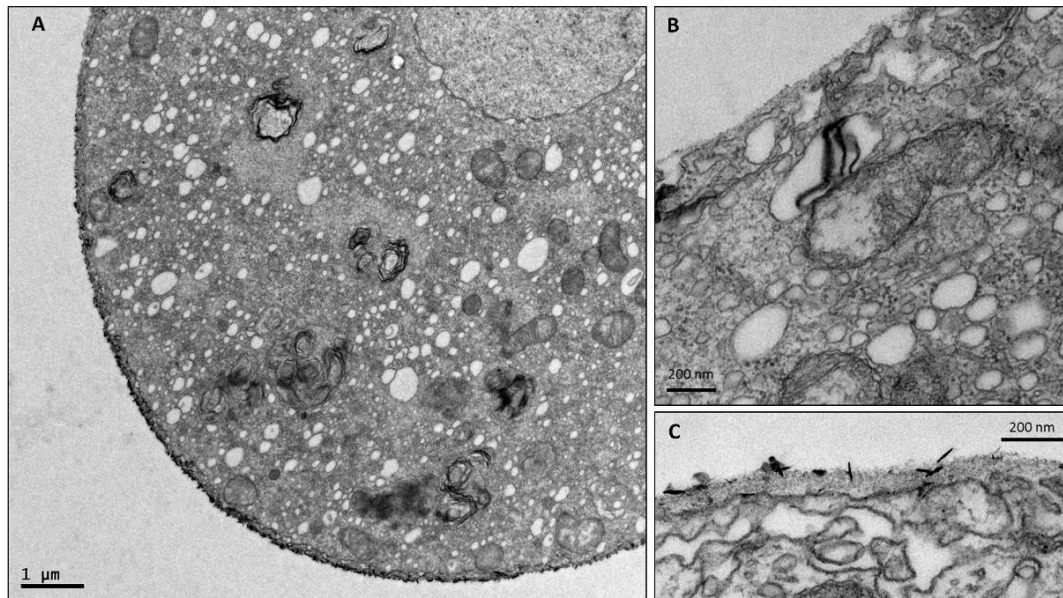


Abbildung 40 *Dot-Gal4 → UAS-CG5731-RNAi d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.*

Die Dot-Gal4 getriebene CG5731-RNAi-Linie zeigt am 14. Lebenstag bereits lamelläre Einschlusskörperchen, die den „Zebra bodies“ in M. Fabry ähneln. (A) Übersichtsaufnahme (B) Vergrößerung eines lamellären Einschlusskörperchens und eines lysierenden Mitochondriums (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die mit Dot-Gal4 getriebene CG5731 RNAi Linie zeigt schon im Alter von 14 Tagen nach Schlupf deutliche Anzeichen einer lysosomalen Speicherkrankheit (Abbildung 40). Im Zytoplasma befinden sich mehrere elektronendichte, lamelläre Einschlusskörperchen, teilweise mit einem elektronendichten Inhalt. Sie weisen eine große Ähnlichkeit mit den für lysosomale Speicherkrankheiten und Morbus Fabry im Menschen typischen, sogenannten „Zebra bodies“, auf. Die Mitochondrien der Nephrozyten sind teilweise nicht mehr intakt und scheinen sich aufzulösen, die Schlitzmembran ist unregelmäßig und die Basalmembran scheint an manchen Stellen leicht verdickt.

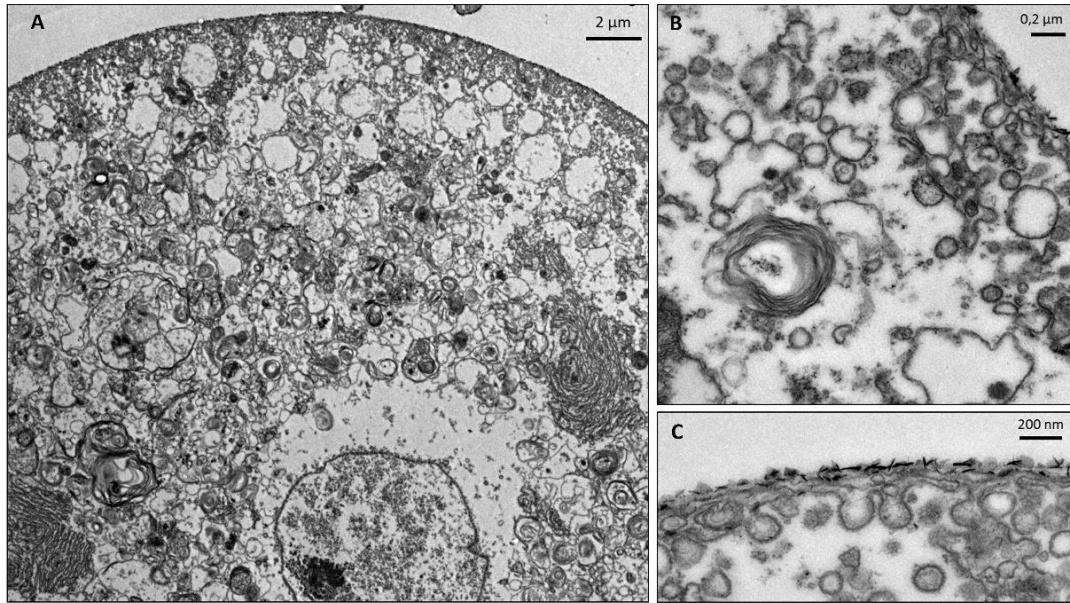


Abbildung 41 *Dot-Gal4 → UAS-CG7997-RNAi d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.*

Die CG7997-RNAi-Linie zeigt am 14. Lebenstag einen stärkeren Phänotyp als die CG5731-RNAi-Linie. Auch hier sind lamelläre Einschlusskörperchen erkennbar. (A) Übersichtsaufnahme (B) Vergrößerung eines lamellären Einschlusskörperchens (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Auch die CG7997-RNAi-Linie zeigt am Tag 14 ähnliche lamelläre Einschlusskörperchen (Abbildung 41). Die Zellstruktur wirkt hier aufgelockerter und das Zytoplasma weniger dicht als in den anderen beiden Genotypen. Auch der Kern, welcher in der Übersichtsaufnahme angeschnitten ist, hat eine weniger solide Struktur als es zu diesem Zeitpunkt üblich ist. Die äußere Oberfläche ist unregelmäßig eingestülpt, die Basallamina ist auf diesen Bildern nicht beurteilbar, da sie von elektronendichten, spitzen Nadeln überlagert wird.

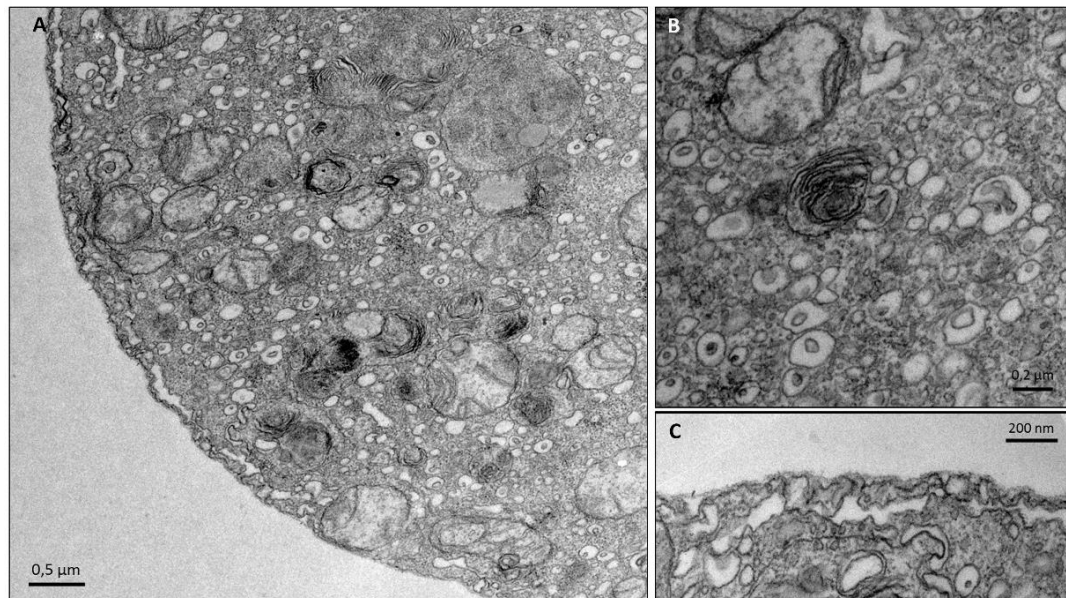


Abbildung 42 *Dot-Gal4 → UAS-CG5731-RNAi, UAS-CG7997-RNAi (DRNAi) d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.*

Die Doppel-RNAi-Linie zeigt am 14. Lebenstag einen ähnlichen Phänotyp wie die CG5731-Knockoutlinie mit lamellären Einschlusskörperchen und Vesikeln im Zytoplasma. (A) Übersichtsaufnahme (B) Vergrößerung der lamellären Einschlusskörperchen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die Doppel RNAi Linie zeigt ein ähnliches Bild wie die CG5731-Knockdownlinie. Auch hier sind aufgequollene, degenerierende Mitochondrien, lamelläre Einschlusskörperchen und nicht weiter zu definierende Vesikel im Zytoplasma zu sehen. Interessant ist, dass es durch den doppelten Knockdown zu keiner sichtbaren Verschlechterung des transmissionselektronenmikroskopischen Phänotyps zu kommen scheint.

Auch von den RNAi Linien wurden TEM Bilder eines späteren Zeitpunkts (d28) angefertigt, um den zeitlichen Verlauf des Knockdown-Phänotyps besser zu charakterisieren.

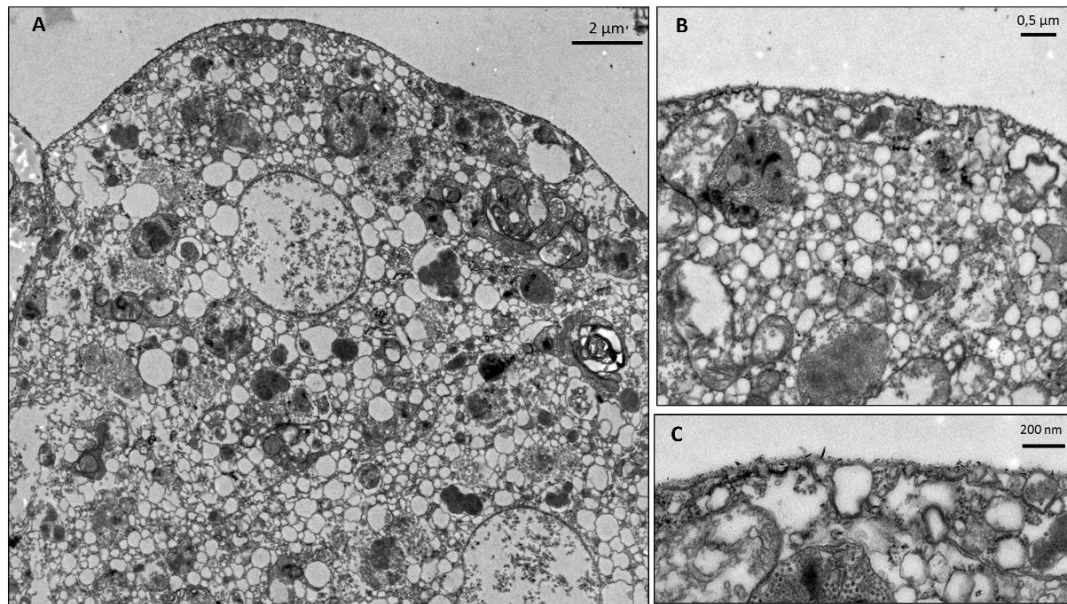


Abbildung 43 Dot-Gal4 → WTB d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.
 Am 28. Lebenstag haben die Nephrozyten der Dot-Gal4-Kontrolle kaum noch den klassischen Aufbau eines Nephrozyten. (A) Übersichtsaufnahme (B) Vergrößerung Zytoplasma und Zelloberfläche (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Am 28. Lebenstag haben die Nephrozyten der Dot-Gal4 Kontrolle kaum noch den charakteristischen Aufbau eines Nephrozyten. Die zum früheren Zeitpunkt noch sehr kleinen Vesikel sind nun deutlich größer und nehmen fast das gesamte Zytoplasma ein. Manche dieser Vesikel haben einen elektronendichten Inhalt. Die Mitochondrien sind fast nicht mehr als solche zu erkennen (Abbildung 43 B), die Zelloberfläche hat nur noch wenige, ungleichmäßig verteilte Membraneinstülpungen.

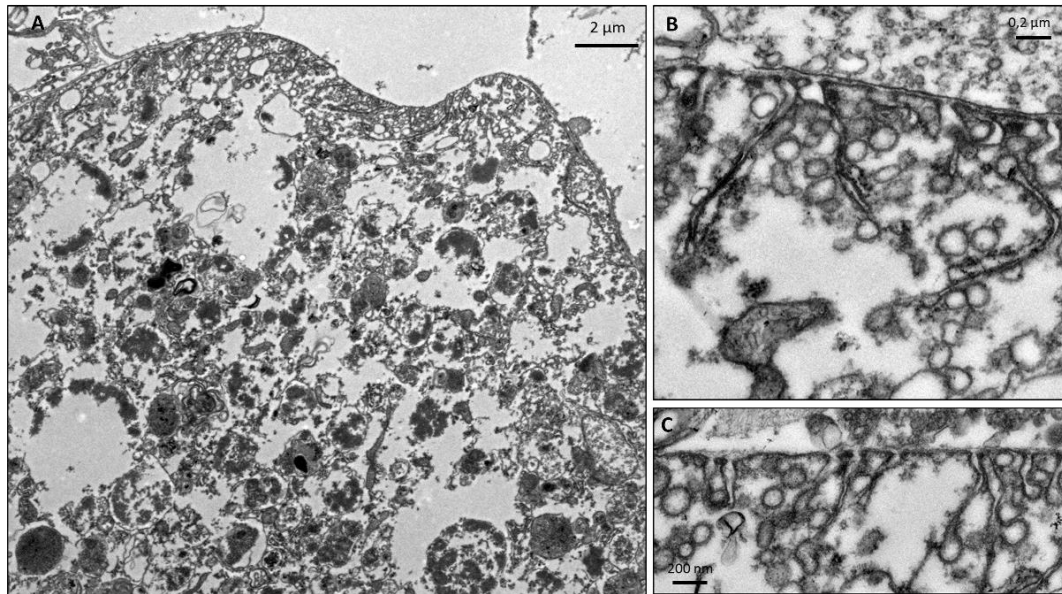


Abbildung 44 *Dot-Gal4 → UAS-CG5731-RNAi d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.*

Auch die CG5731-RNAi-Linie zeigt eine sehr aufgelöste, löchrige Zellstruktur auf. (A) Übersichtsaufnahme (B) Vergrößerung der Zelloberfläche (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die Dot-Gal4 getriebene CG5731 RNAi Linie hat eine sehr lose Zellstruktur und das Zytoplasma weist an vielen Stellen große Löcher auf (Abbildung 44 A). Zellorganellen sind fast keine mehr erkennbar, einige kleinere Vesikel sind über das gesamte Zytoplasma verteilt. Die Zelloberfläche ist im Vergleich zum Rest der Zelle recht gut erhalten, es sind noch unregelmäßig Membraneinstülpungen und langgezogene Lakunen sowie eine Schlitzmembran erkennbar. (Abbildung 44 B und C) In den Nephrozyten die ausgewertet wurden, war jedoch kein fabryspezifischer Phänotyp mehr zu sehen.

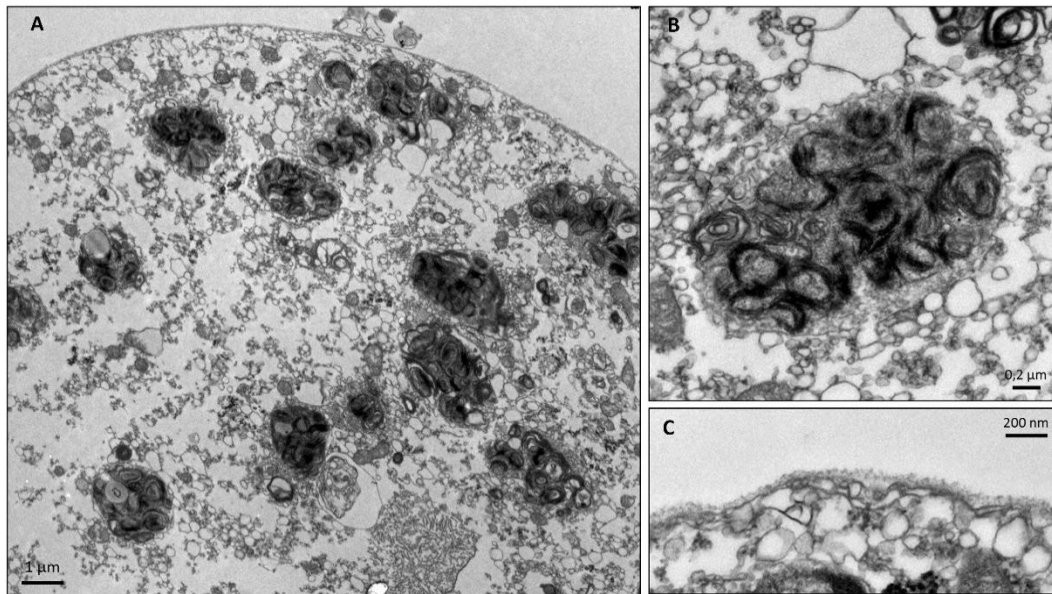


Abbildung 45 *Dot-Gal4 x UAS-CG7997-RNAi d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.*

Am 28. Lebenstag zeigt die CG7997-RNAi-Linie einen Phänotyp, der dem der Patientenbiopsien aus der Niere mit den für M. Fabry typischen „Zebrabodies“ sehr ähnlich sieht. (A) Übersichtsaufnahme (B) Vergrößerung der lamellären Einschlusskörperchen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche mit Basallamina, Lakunen und Schlitzmembran.

Die Dot-Gal4 getriebene CG7997-RNAi-Linie zeigt am 28. Lebenstag den stärksten Fabry-ähnlichen Phänotyp. Das Zytoplasma weist unzählige elektronendichte, lamelläre Einschlusskörperchen auf, die in Gruppen zusammenliegen. Der Rest der Zelle hat eine lose Struktur, im Zytoplasma sind noch wenige, kleine bis mittelgroße dünnwandige Vesikel zu erkennen. Die Zelloberfläche weist praktisch keine typischen Membraneinstülpungen mehr auf.

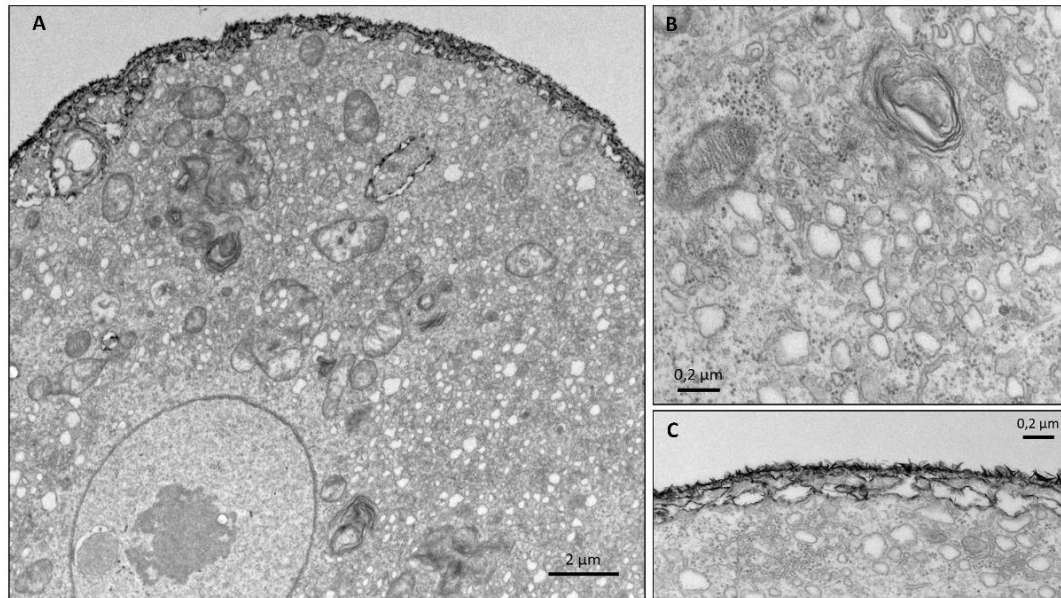


Abbildung 46 *Dot-Gal4 → UAS-CG5731-RNAi, UAS-CG7997-RNAi d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.*

Auch am 28. Lebenstag zeigt die Doppel-RNAi-Linie keinen verstärkten Phänotyp im Gegensatz zu den einzelnen RNAi-Linien. (A) Übersichtsaufnahme mit angeschnittenem Zellkern (B) Vergrößerung der lamellären Einschlusskörperchen (C) Vergrößerung der äußeren Oberfläche, durch elektronendichte Nadeln nicht gut beurteilbar.

Abbildung Ergebnisse 3.2.8 zeigt die perikardialen Nephrozyten einer 28 Tage alten, mit Dot-Gal4 getriebenen Doppel-RNAi-Fliege. Auch hier sind unzählige Einschlusskörperchen erkennbar, sie sind jedoch weniger elektronendicht als in der reinen CG7997 Knockdown Fliege. Dies kann jedoch auch an der allgemein geringeren Kontrastierung dieser Bilder liegen.

Die Schlitzmembran ist auf Grund der Anlagerung von spitzen, elektronendichten Nadeln nicht beurteilbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den ausgewerteten Nephrozyten der Knockout Linien beider Gene kein klassischer, Fabry-ähnlicher Phänotyp aufgefallen ist. Die CG5731-Knockoutlinie entsprach in ihrer Ultrastruktur größtenteils der Wildtypkontrolle. Die CG7997-Knockoutlinie zeigte jedoch schon am 14. Lebenstag eine deutliche Schädigung der Nephrozyten und die Anhäufung von nicht weiter definierbaren, dünnwandigen Vesikeln.

Die RNAi Linien zeigten beide schon am 14. Lebenstag die für Morbus Fabry klassischen lamellären Einschlusskörperchen. Auch hier war die CG7997-RNAi-Linie deutlich schwerer betroffen als die CG5731-RNAi-Linie. Ein Doppelknockdown beider Gene schien den Phänotyp jedoch nicht zu verschlechtern.

4. Rasterelektronenmikroskopie

Zusätzlich zu den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden zur Beurteilung der Zellform und Oberfläche in Kooperation mit Dr. Martin Helmstädter rasterelektronenmikroskopische Bilder der Fabry-Nephrozyten angefertigt. Da die CG5731-Knockoutlinie in den TEM-Aufnahmen keinen sichtbaren Phänotyp zeigte, wurden ausschließlich SEM-Bilder der CG7997-Knockoutlinie im Vergleich zum Wildtyp angefertigt (Abbildung 47).

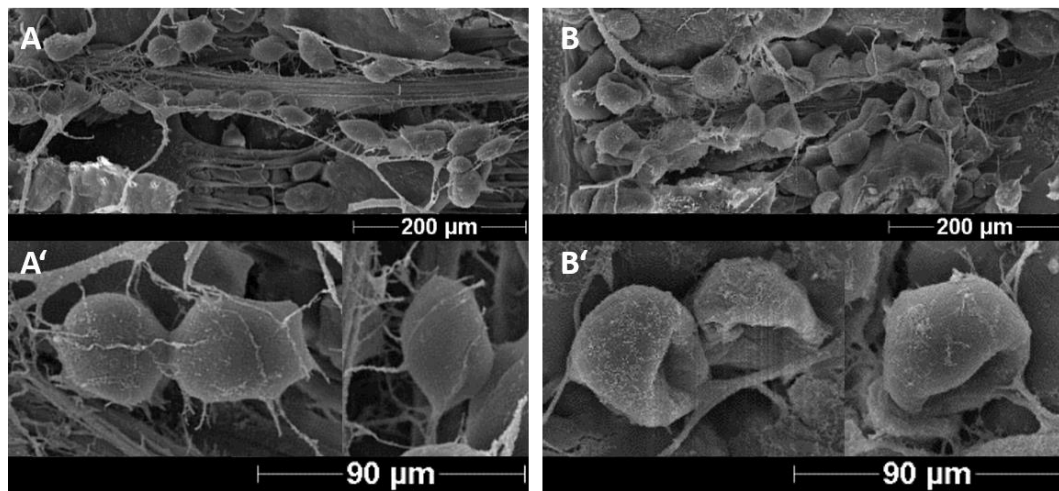


Abbildung 47 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der perikardialen Nephrozyten von 28 Tage alten Fliegen.

Die Nephrozyten der WTB-Kontrolle sind insgesamt kleiner als die des CG7997-Knockouts, welche an einer Seite wie zusammengefallen erscheinen. (A und A') Wildtyp Berlin (B und B') CG7997 Knockout.

Die Aufnahmen zeigen einen deutlichen Größenunterschied der untersuchten perikardialen Nephrozyten. Die Nephrozyten des CG7997 Knockouts sind deutlich größer, und an einer Seite wirken sie wie zusammengefallen. In Anbetracht des TEM-Phänotyps am 28. Lebenstag, als in dieser Linie innerhalb der Zellen kaum noch Material im Zytoplasma zu sehen war, ist dieser Effekt nicht überraschend.

5. CG7997 – Lokalisation

Um Informationen über das Expressionsmuster des Genproduktes von CG7997 zu erhalten, wurde mit einer fluoreszenzmarkierten Linie gearbeitet, die kommerziell über VDRC erhältlich ist.

Als erster Schritt sollte die Expression in den Nephrozyten geprüft werden. Da eine Fixation mit 4% PFA in PBS das GFP-Signal stark abschwächte, wurden perikardiale Nephrozyten ohne Fixation und folglich ohne Cofärbung eingedeckelt und direkt mikroskopiert (Abbildung 47).



Abbildung 48 Adulte perikardiale Nephrozyten der CG7997-GFP Linie, d7.

Das Genprodukt von CG7997 ist am 7. Lebenstag in den perikardialen Nephrozyten exprimiert. (A) GFP Kanal, Größenbalken 100 μm .

Aus Abbildung 48 geht hervor, dass das Genprodukt von CG7997 in den perikardialen Nephrozyten von *Drosophila* am 7. Lebenstag stark exprimiert wird. Das umliegende Gewebe (hauptsächlich Fettgewebe, Muskulatur und Herzschlauch) zeigt sehr wenig bis gar kein Signal.

Um die subzelluläre Lokalisation in der Zelle zu studieren, wurden Kofärbungen mit den endosomalen Markern Rab5 und Rab7 (Abbildung 48) an den einfacher zu färbenden Garlandzellen durchgeführt.

Rab5 ist ein Marker für frühe Endosomen. Das Protein gehört zur Gruppe der Ras-like GTPasen, lokalisiert in der Membran von frühen Endosomen und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei deren homotypischen Fusion^{122,123}. Auch Rab7 gehört zu dieser Gruppe der G-Proteine und lokalisiert sowohl in frühen, aber besonders in späten Endosomen¹²⁴. Es gehört zu den am besten untersuchten Rab Proteinen und hat verschiedene Aufgaben, unter anderem spielt es eine Rolle bei der Reifung von frühen Endosomen zu späten Endosomen und deren Transport zu den Lysosomen^{125,126,127}.

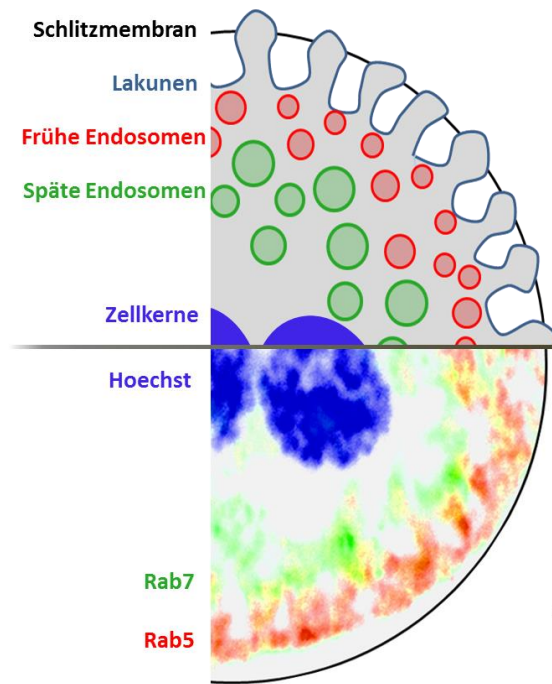


Abbildung 49 Schema der endosomalen Kompartimente und ihrer korrespondierenden Marker in der Immunfluoreszenzfärbung von *Drosophila* Nephrozyten.

Eigene Abbildung.

Das CG7997-GFP Signal wurde zur Verdeutlichung des Signals durch eine Färbung mit anti-GFP verstärkt (Abbildung 49).

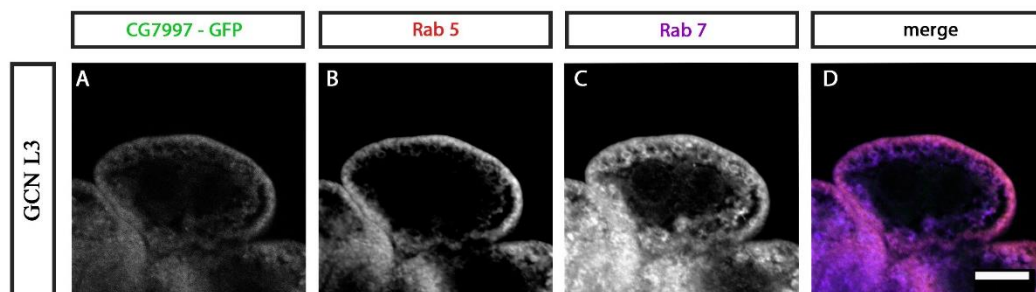


Abbildung 50 GCN des dritten Larvenstadiums, Immunfluoreszenzfärbung der endosomalen Kompartimente.

In Garlandzellen des dritten Larvenstadiums kolokalisiert das CG7997-GFP-Signal sowohl mit der Färbung für frühe (Rab 5) als auch geringfügig mit der für späte (Rab 7) Endosomen. (A) CG7997-GFP (B) Rab5 Färbung als Marker für frühe Endosomen, 568 nm (C) Rab7 Färbung als Marker für späte Endosomen, 647 nm (D) alle Kanäle, Größenbalken 10 µm.

Eine eindeutige Zuteilung zu nur einem der beiden hier gefärbten Endosomenkompartimente der Nephrozyten kann nicht vorgenommen werden. Das stärkste GFP Signal befindet sich in der Peripherie der Zellen im Bereich der frühen Endosomen, allerdings ist ein schwächeres Signal auch im Bereich der späten Endosomen sichtbar.

6. Funktionelle Charakterisierung

6.1. Überlebenskurve

Um die allgemeine Viabilität der Fliegenlinien zu untersuchen, wurde eine Überlebenskurve der beiden Knockoutlinien und der Wildtypkontrolle angefertigt.

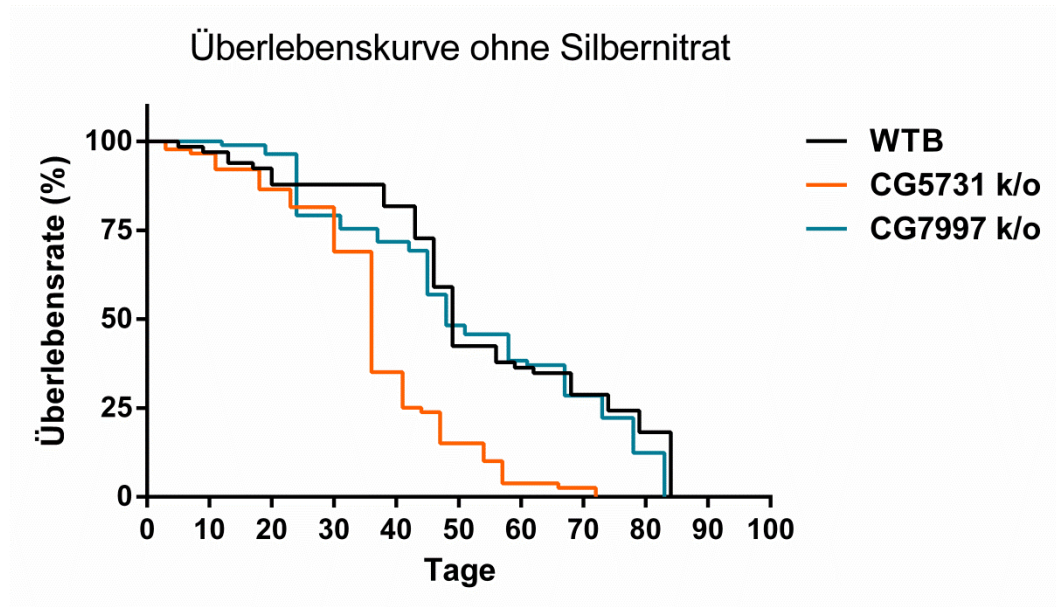


Abbildung 51 Überlebenskurve ohne Silbernitrat.

Die CG5731-Knockoutlinie zeigt eine höhere Mortalität als die CG7997-Knockoutlinie und die Kontrolle.

Die Überlebenskurven der Wildtypkontrolle und der CG7997-Knockoutlinie unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 51 Überlebenskurve ohne Silbernitrat). Die CG5731-Knockoutlinie zeigt jedoch eine höhere Mortalität als die Kontrolle, der P-Wert des Log-Rank Tests beträgt $<0,0001$.

Außerdem wurde die Überlebenszeit dieser drei Linien auf silbernittrathaltigem Medium verglichen. Dies lieferte erste Hinweise auf die Nephrozytenfunktion, da Silbernitrat aus dem Darm in die Hämolymphe gelangt und dort von den Nephrozyten aufgenommen wird. Können die Nephrozyten diese Funktion nicht oder nur eingeschränkt erfüllen, so entwickelt das Silbernitrat im Körper seine schädigende Wirkung und verursacht den frühzeitigen Tod der betroffenen Fliegen.

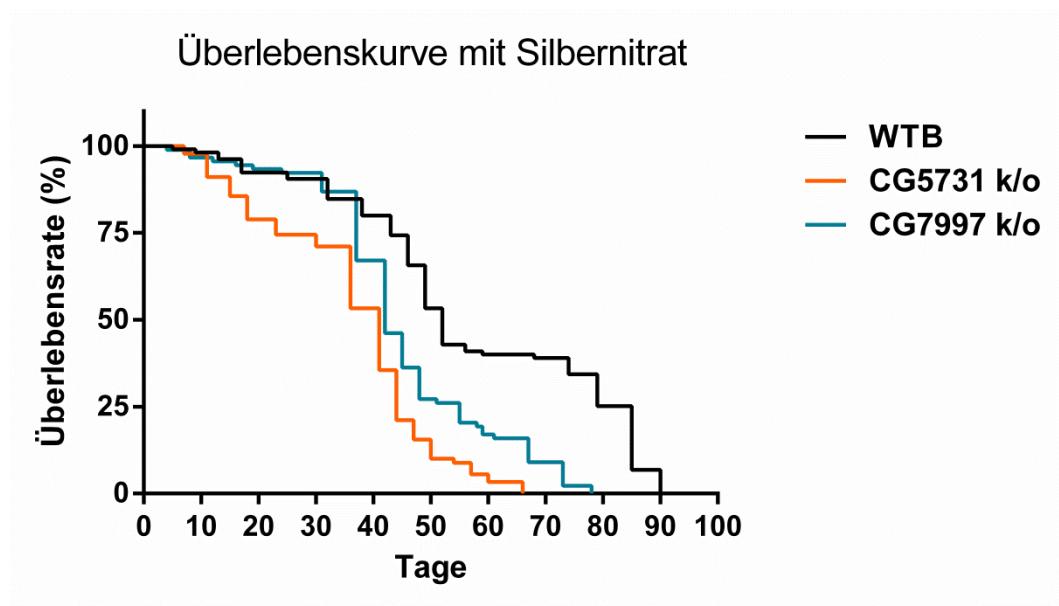


Abbildung 52 Überlebenskurve mit Silbernitrat.

Auf mit Silbernitrat versetztem Medium zeigen sowohl die CG5731- als auch die CG7997-Knockoutlinie eine erhöhte Mortalität.

Auf dem mit Silbernitrat versetzten Medium zeigt auch die CG7997-Knockoutlinie eine signifikant höhere Mortalität als die Kontrolle. Dieses Versuchsergebnis ist ein erster Hinweis auf eine mögliche Schädigung der Nephrozyten und einer geringeren Toxinclearance aus der Hämolymphe. Auch die CG5731-Knockoutlinie zeigt eine geringere Viabilität auf Toxinmedium als die Wildtypkontrolle. Diese unterscheidet sich jedoch nicht von der Viabilität dieser Linie auf dem Medium ohne Silbernitrat. Der P-Wert des Log-Rank-Tests liegt für beide Linien im Vergleich mit dem Wildtyp bei $<0,0001$.

6.2. Nephrozytenfunktion: Endogener Uptakeversuch der RNAi-Linien

Eine der Hauptaufgaben der Nephrozyten besteht in der Filtration von schädlichen Stoffen aus der Hämolymphe und deren anschließender Endozytose. Ein einfacher Test zum Nachweis dieser Zellfunktion ist ein endogener Uptake Versuch mit der kombinierten Treiber- und Reporterlinie Dot-Gal4, Hand-GFP, MHC-ANF-RFP.

Dot-Gal4 ist ein Treiber für perikardiale Nephrozyten, Hand-GFP markiert diese zusätzlich grün, um die Zellen im Mikroskop auffindbar zu machen und wird später für die Quantifizierung als Schablone genutzt.

Der Muskelgewebeenhancer MHC (Myosin heavy chain) sorgt für die ständige Produktion und Exozytose von ANF (atrium natriuretic factor), welcher an ein RFP (red fluorescent protein) gekoppelt ist. Das genetische Element "MHC-ANF-RFP"

sorgt also dafür, dass ständig endogen produziertes, rot markiertes Protein aus Muskelzellen exozytiert wird und in der Hämolymphe zirkuliert. Dieser Stoff wird von den Nephrozyten filtriert und aufgenommen. So kann die Funktion der Nephrozyten untersucht und später quantifiziert werden.

Dieser Treiberstamm („TS“) wurde mit den beiden UAS-RNAi Stämmen sowie mit der Doppel-RNAi Linie verkreuzt und mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle verglichen. Durch diese Kreuzung erhält man in der F₁-Generation eine Kombination aus einem endogenen Marker für die Endozytosefunktion und einer zelltypspezifischen RNAi Expression, deren Auswirkung so untersucht werden können. Als Positivkontrolle diente eine Kreuzung mit dem Wildtyp Berlin, die Negativkontrolle war eine Kreuzung mit UAS-kirre-RNAi. Der Knockdown des Nephrozytenmembranproteins kirre führt zu einer mangelhaften Ausbildung der Nephrozytenmembran und des Lakunensystems der Nephrozyten und damit zu einer starken Einschränkung der Endozytosefunktion.

Aus der resultierenden F₁-Generation wurden jeweils 10 gleichgroße Larven des zweiten Larvenstadiums ausgewählt und die Fluoreszenzintensität mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Davon wurden nach dem Zufallsprinzip 8 Bilder ausgewählt und für die Quantifizierung mit dem Programm CellProfiler genutzt.

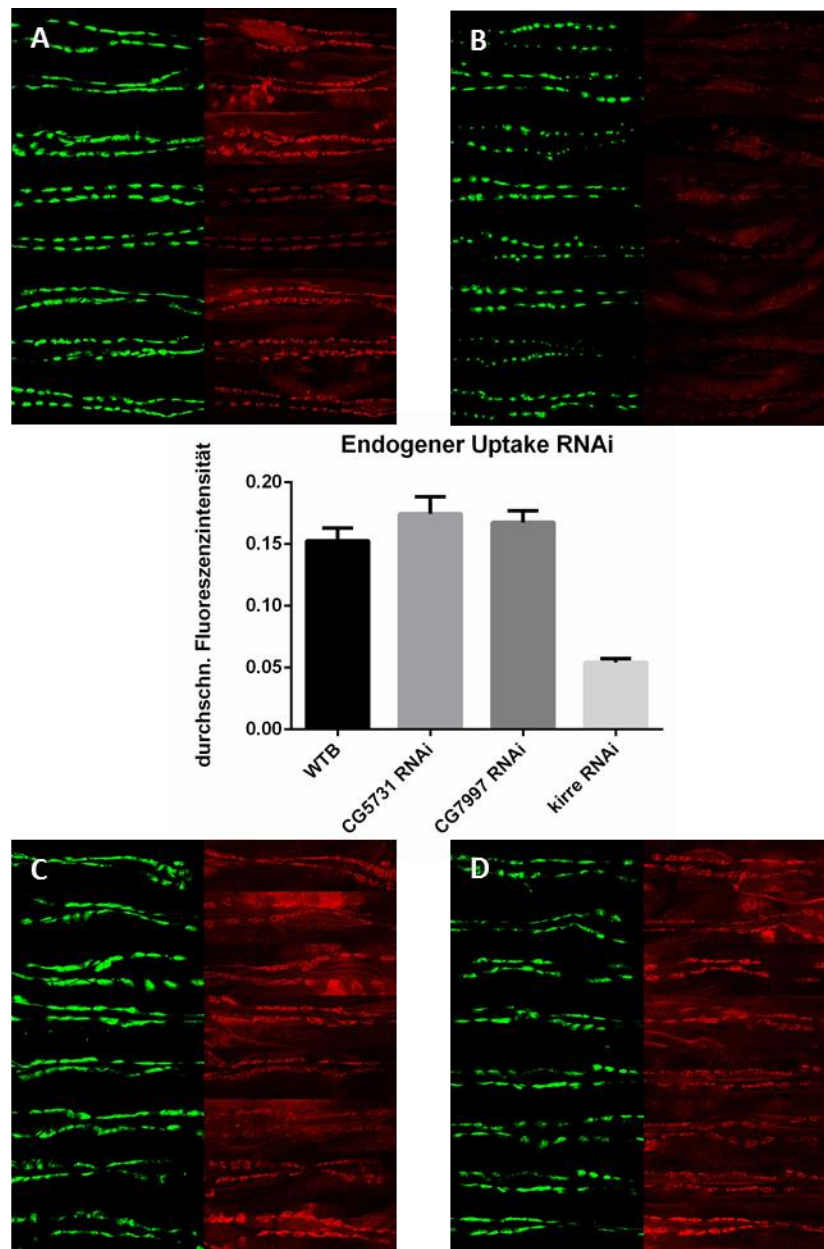


Abbildung 53 Endogener Uptake Versuch der RNAi-Linien.

Der Uptake der Fabry-RNAi-Linien unterscheidet sich nicht signifikant von der Positivkontrolle. 488 nm: Hand-GFP, 568 nm: ANF-RFP. (A) TS x WTB (B) TS x kirre RNAi (C) TS x CG7997 RNAi (D) TS x CG5731 RNAi Mitte: Quantifizierung mit dem Programm Cellprofiler, Grafik erstellt mit dem Programm GraphPad Prism.

Abbildung 53 zeigt die Ergebnisse des ersten Durchlaufs des Versuchs. Man sieht einen deutlichen Unterschied im roten Kanal der WTB und der Kirre RNAi Linie. Auch in der Quantifizierung mit dem Programm Cellprofiler zeigt sich die Differenz als signifikant (ungepaarter t-Test, $P < 0,0001$). Die Funktion dieser beiden Linien als Positiv- bzw. Negativkontrolle ist daher gewährleistet.

Weder in den Rohdaten noch in der Quantifizierung wich der Uptake der beiden Fabry-Kandidaten signifikant von der WTB Kontrolle ab (Abbildung 53).

Die Doppel-RNAi Linie war zum Zeitpunkt des ersten Durchlaufs noch nicht verfügbar und wurde deshalb zu einem späteren Zeitpunkt separat wiederholt. Das Futtermedium der Larven wurde in diesem Durchlauf durch eine Agarose-Traubensaft-Platte mit Hefezusatz ersetzt, da unter diesen Bedingungen eine bessere Trennschärfe erreicht wird.

Auffällig war dabei, dass die Größe der Larven in der DRNAi Linie stark variierte. Es waren keine 10 gleich großen Larven auffindbar, weshalb man sich für die Auswertung von 5 größeren und 5 kleineren Larven entschied. Die größeren Larven hatten in der Auswertung einen normalen Uptake, die kleineren Larven hatten einen sehr geringen bis fast keinen Uptake (Abbildung 54).

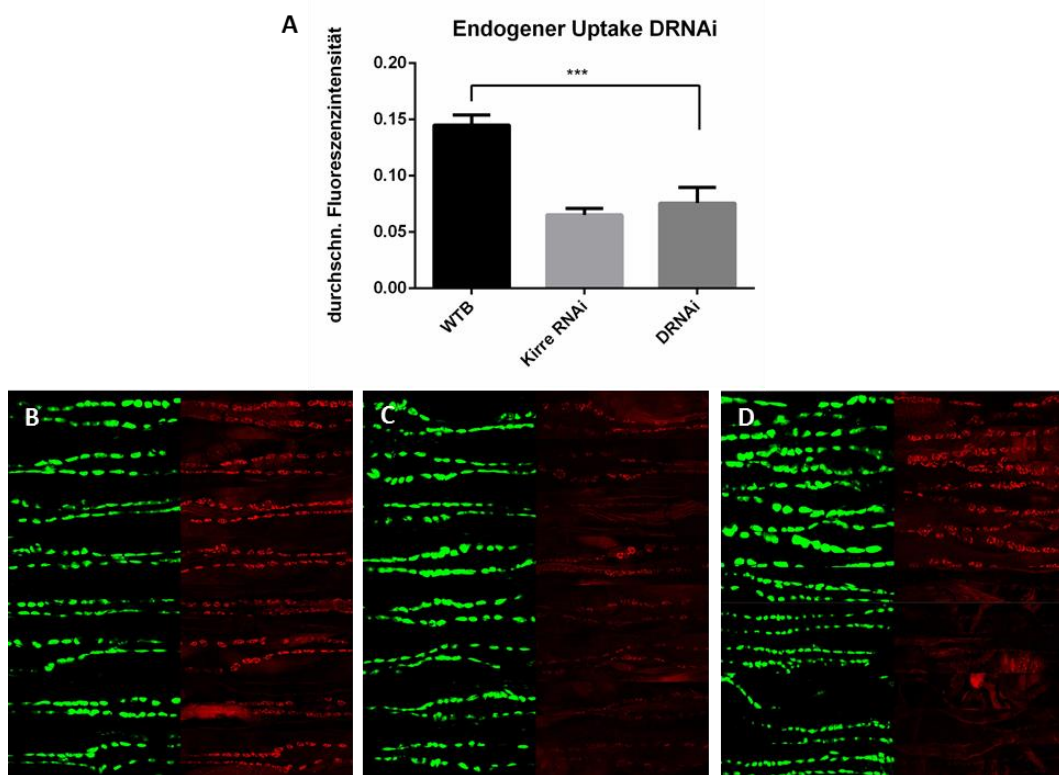


Abbildung 54 Endogener Uptake der Doppel-RNAi Linie im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle.

Die kombinierte RNAi-Linie zeigt sowohl Larven mit normalem Uptake, sowie Larven mit vermindertem Uptake. 488 nm: Hand-GFP, 568 nm: UAS-ANF-RFP. (A) Quantifizierung mit dem Programm Cellprofiler (B) TS x WTB (C) TS x Kirre RNAi (D) TS x DRNAi. Grafik erstellt mit GraphPad Prism.

Eine sichere Erklärung dieses Phänomens ist nicht möglich und es kann nur über mögliche Ursachen spekuliert werden, auf die im Diskussionsteil näher eingegangen wird.

Insgesamt war die Aufnahme von ANF-RFP bei der Doppel-RNAi Linie reduziert. Auf Grund der Größendifferenz der Larven sollte dieses Ergebnis jedoch nicht

überinterpretiert werden.

6.3. Nephrozytenfunktion: Silbernitrataufnahme von Garlandzellen der Knockoutlinien

Um auch die Knockoutlinien mit einem kontinuierlich verfügbaren endogenen Marker auf ihre Endozytosefunktion zu testen, wurde nach Lorincz et al. ein Fütterungsversuch mit dem für *Drosophila* toxischen Silbernitrat durchgeführt¹⁰⁸. Silbernitrat gelangt nach oraler Aufnahme in die Hämolymphe der Fliege, und wird dort von den Nephrozyten filtriert und endozytiert.

Für diesen Versuch wurde dem klassischen *Drosophila* Futterbrei Silbernitrat in einer Konzentration von 0,005% zugesetzt. Adulte, unbehandelte Fliegen legten ihre Eier auf diesem Brei ab und nach etwa 10 Tagen konnten die geschlüpften Larven (Stadium 3) gesammelt und untersucht werden. Die Garlandzellen wurden wie beschrieben präpariert und mittels Durchlichtmikroskopie ausgewertet.

Schon bei der Präparation der Zellen fiel die dunkelgelbe Farbe der Nephrozyten und der Malpighischen Schläuche auf, die normalerweise durchscheinend weißlich gefärbt sind. Um diesen Effekt in der Durchlichtmikroskopie noch zu verstärken, wurden die fertig eingedeckelten Präparate für 30 Sekunden mit UV-Licht bestrahlt, damit sich die gelben Einschlüsse dunkelbraun verfärben (Abbildung 55).

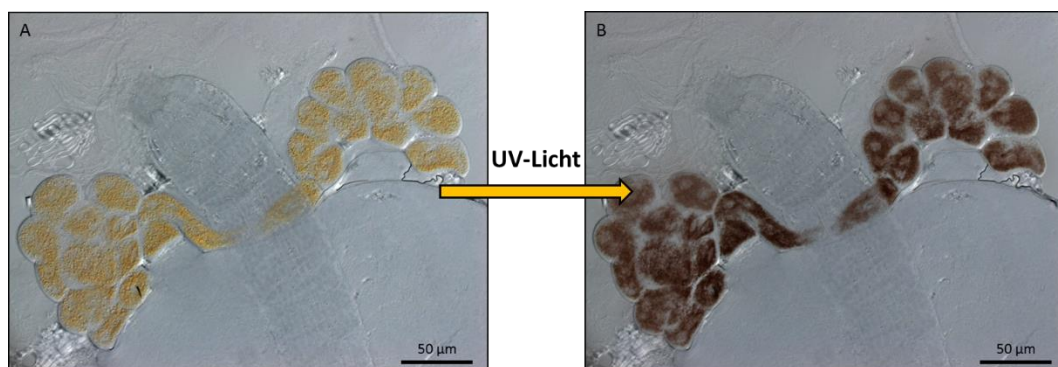


Abbildung 55 Farbentwicklung der Silbernitratablagerungen in WTB Garlandzellen nach 30s Belichtung mit DAPI-Laser (358 nm).

Eine Belichtung der Präparate mit dem DAPI-Laser ändert die Farbe der gelben Silbernitrat-Einschlusskörperchen zu braun. (A) Vor Belichtung mit DAPI Laser (B) Nach Belichtung mit DAPI Laser.

Entgegen der Erwartung sah man weniger einen Unterschied in der Quantität des aufgenommenen Silbernitrats, sondern vielmehr in der qualitativen Verteilung in der Zelle (Abbildung 56).

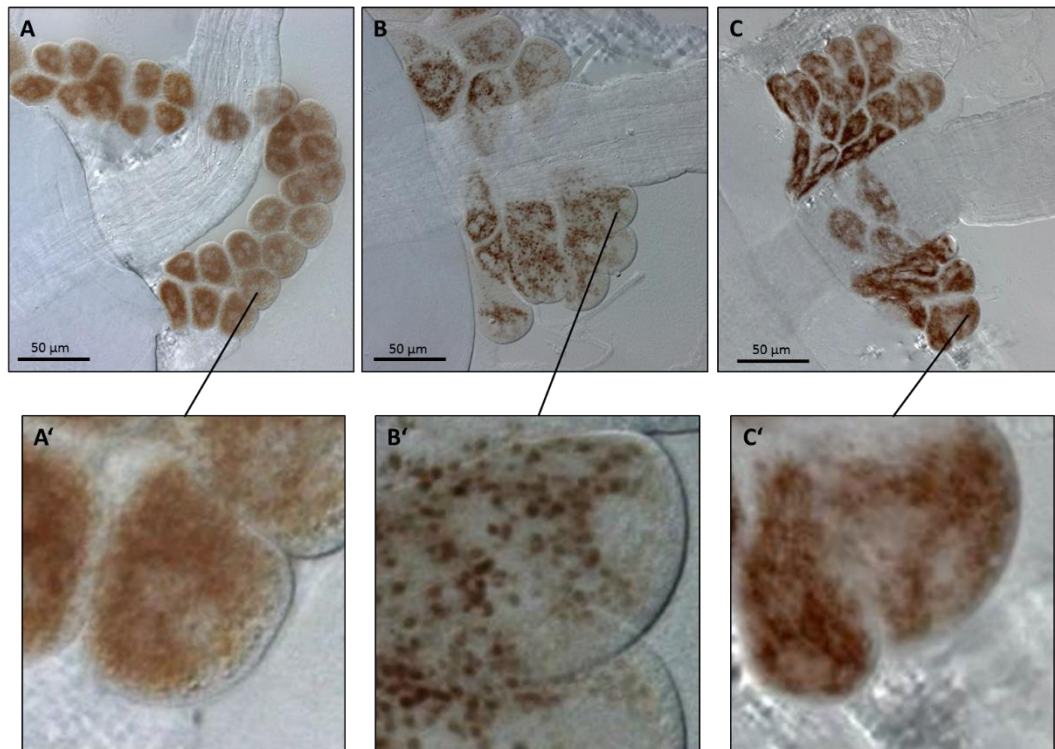


Abbildung 56 Silbernitrat Aufnahme in Larve 3 Garlandzellen.

Die CG7997-Knockoutlinie zeigt eine Auffälligkeit im Verteilungsmuster des Silbernitrats in der Zelle. Die braunen Einschlusskörperchen sind nicht wie in den beiden anderen Linien gleichmäßig über die Zelle verteilt, sondern bilden Akkumulate im Zytoplasma. (A) WTB (B) CG7997k/o (C) CG5731 k/o. In den vergrößerten Bildausschnitten (A' - C') ist besonders deutlich die unterschiedliche Verteilung innerhalb der Zelle zu erkennen.

Während die Silbernitrat Ablagerungen in der Kontrolle und in der CG5731-Knockoutlinie gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma verteilt zu sein scheinen, haben sich in der CG7997-Knockoutlinie größere, unregelmäßig verteilte Akkumulate gebildet. Ob diese Ablagerungen frei im Zytoplasma vorliegen, oder innerhalb von Vesikeln, kann anhand dieser Bilder nicht beurteilt werden. Die weitere Charakterisierung dieses Phänotyps und eventuell sogar die Ursache für dieses Phänomen soll mittels weiterer Versuche in dieser Arbeit geklärt werden.

Die Quantität des aufgenommenen Silbernitrats ist auf Grund der unterschiedlichen Verteilung über die Zelle in den drei Genotypen nur schwer zu vergleichen. Anhand dieser Bilder kann eine Reduktion der Silbernitratmenge in der CG7997-Knockoutlinie vermutet werden, dieses Ergebnis sollte jedoch nicht überinterpretiert werden.

6.4. Nephrozytenfunktion: Gepulster ex-vivo Uptake von adulten Nephrozyten

Die vorhergegangenen Versuchsergebnisse zur Nephrozytenfunktion beurteilten die Endozytosefunktion über einen längeren Zeitraum hinweg. Um Abbau- bzw. Umbauprozesse innerhalb der Zelle, die zu einer Degradierung des Markers führen, und Akkumulationseffekte, welche das Ergebnis verfälschen können, auszuschließen, wurde ein gepulster Uptakeversuch mit FITC-markiertem Albumin durchgeführt.

Dazu wurden die perikardialen Nephrozyten von adulten Fliegen (14 bzw. 28 Tage alt) wie beschrieben präpariert und für 5 Minuten mit einer 0,2 mg/ml FITC-Albuminlösung inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Endozytose durch mehrmaliges Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen fixiert und eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie und die Quantifizierung durch Messen der Fluoreszenzintensität/Fläche. Beim Anfertigen der Bilder wurde genau darauf geachtet, die Bildebene immer in die Mitte der Zelle zu legen, um die Quantifizierung nicht zu verfälschen. Das Schema der Endozytosefunktion eines *Drosophila* Nephrozyten und dessen Sichtbarmachung in der konfokalen Mikroskopie mit FITC-Albumin ist in Abbildung 57 dargestellt.

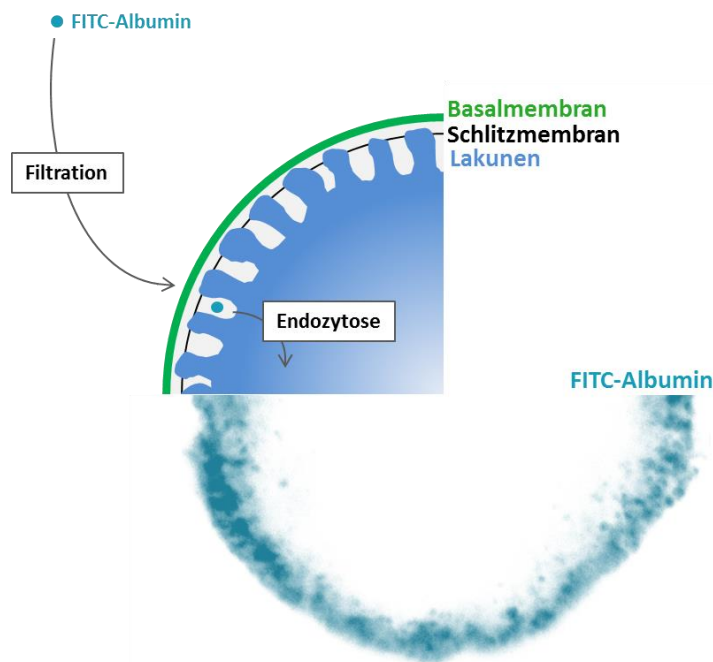


Abbildung 57 Schema der Endozytosefunktion eines *Drosophila* Nephrozyten mit FITC-Albumin. Eigene Abbildung.

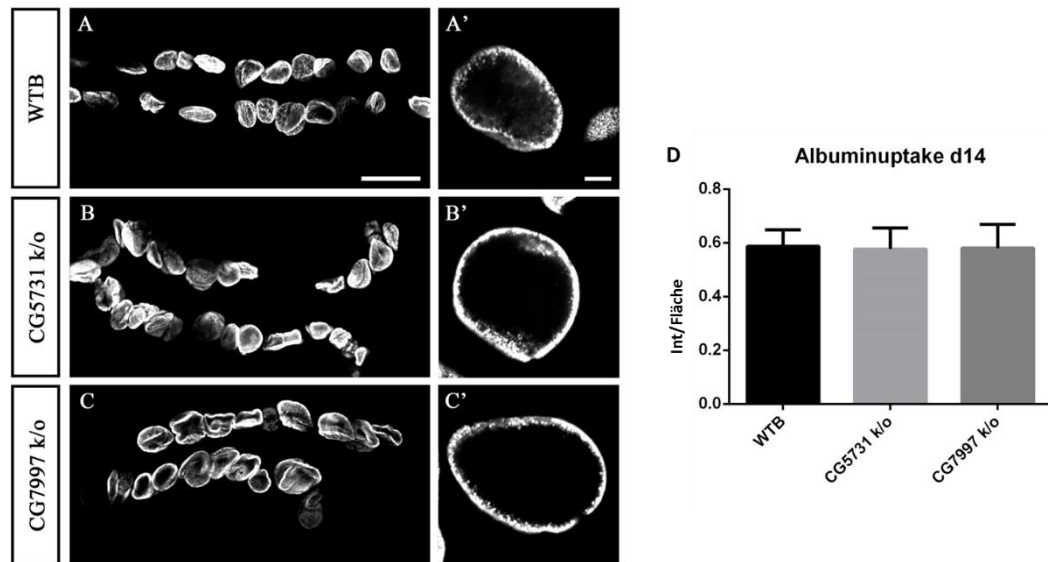


Abbildung 58 Albuminuptake perikardialer Nephrozyten d14.

Am 14. Lebenstag haben die untersuchten Nephrozyten der beiden Knockoutlinien eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aufnahmerate des Albumins. (A) WTB 10x Vergrößerung (A') WTB 60x Vergrößerung (B) CG5731 Knockout 10x Vergrößerung (B') CG5731 Knockout 60x Vergrößerung (C) CG7997 Knockout 10x Vergrößerung (C') CG7997 Knockout 60x Vergrößerung. Größenbalken 10x: 100 μm , 60x: 10 μm (D) Quantifizierung der 60x Vergrößerungen, $y = \text{Fluoreszenzintensität/Fläche}$. Grafik erstellt mit GraphPad Prism.

Am 14. Lebenstag zeigten die perikardialen Nephrozyten der beiden Knockoutlinien noch kein Defizit der Endozytoserate im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 58).

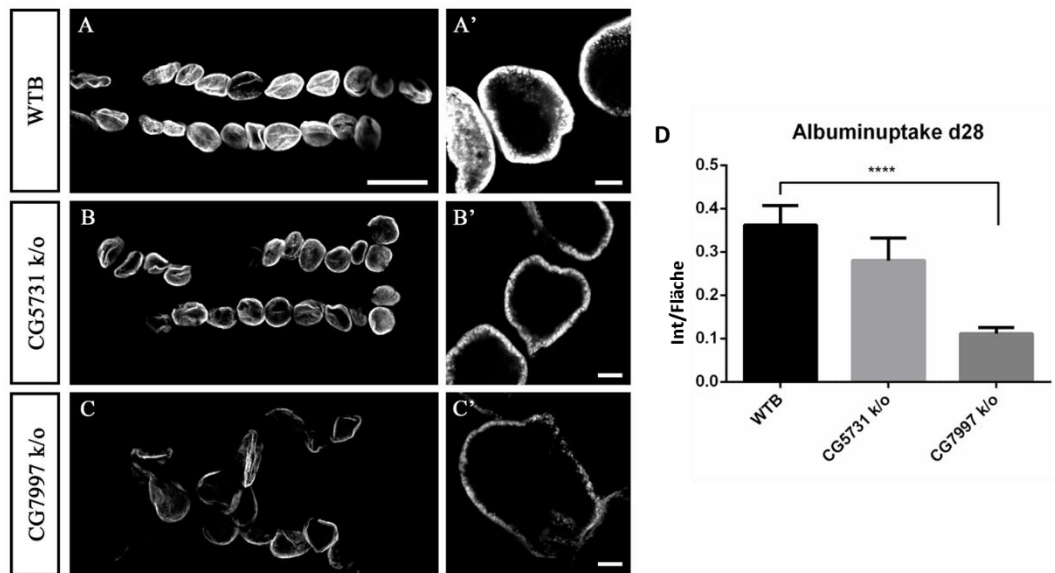


Abbildung 59 Albuminuptake perikardialer Nephrozyten d28.

Am 28. Lebenstag geht die Aufnahmerate für Albumin in den beiden Knockoutlinien deutlich zurück. (A) WTB 10x Vergrößerung (A') WTB 60x Vergrößerung (B) CG5731 Knockout 10x Vergrößerung (B') CG5731 Knockout 60x Vergrößerung (C) CG7997 Knockout 10x Vergrößerung (C') CG7997 Knockout 60x Vergrößerung. Größenbalken 10x: 100 μ m, 60x: 10 μ m (D) Quantifizierung der 60x Vergrößerungen, Fluoreszenzintensität/Fläche. Grafik erstellt mit GraphPad Prism.

Am 28. Lebenstag sieht man im Vergleich zu den jüngeren, 14 Tage alten Fliegen schon einen deutlichen Rückgang der Endozytoserate. Dies ist vermutlich auf die Alterung der Fliegen zurück zu führen. Insgesamt haben aber beide Knockoutlinien im Alter eine stärkere Schädigung der Endozytosefunktion, besonders aber die CG7997-Knockoutlinie. Sie hat mit einer Fluoreszenzintensität/Fläche von 0,125 weniger als die Hälfte des von der Kontrollinie aufgenommenen FITC-Albumins endozytiert (Abbildung 59).

7. Biologische Charakterisierung

7.1. Endozytose

Die Ergebnisse des Silbernitrat Fütterungsversuches von *Drosophila* Larven zeigten qualitative Auffälligkeiten in der Aufnahme und Speicherung von Silbernitrat in der CG7997 Knockoutlinie. Um den Zustand des endolysosomalen Kompartiments zu untersuchen und den Phänotyp weiter zu charakterisieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Markern für frühe (Rab5) und späte (Rab7) Endosomen durchgeführt.

Es handelt sich hierbei um die selben Antikörper, die auch schon für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von CG7997 verwendet wurden. Eine detaillierte Beschreibung der beiden GTPasen Rab5 und Rab7 findet sich im Abschnitt 4 dieser Arbeit.

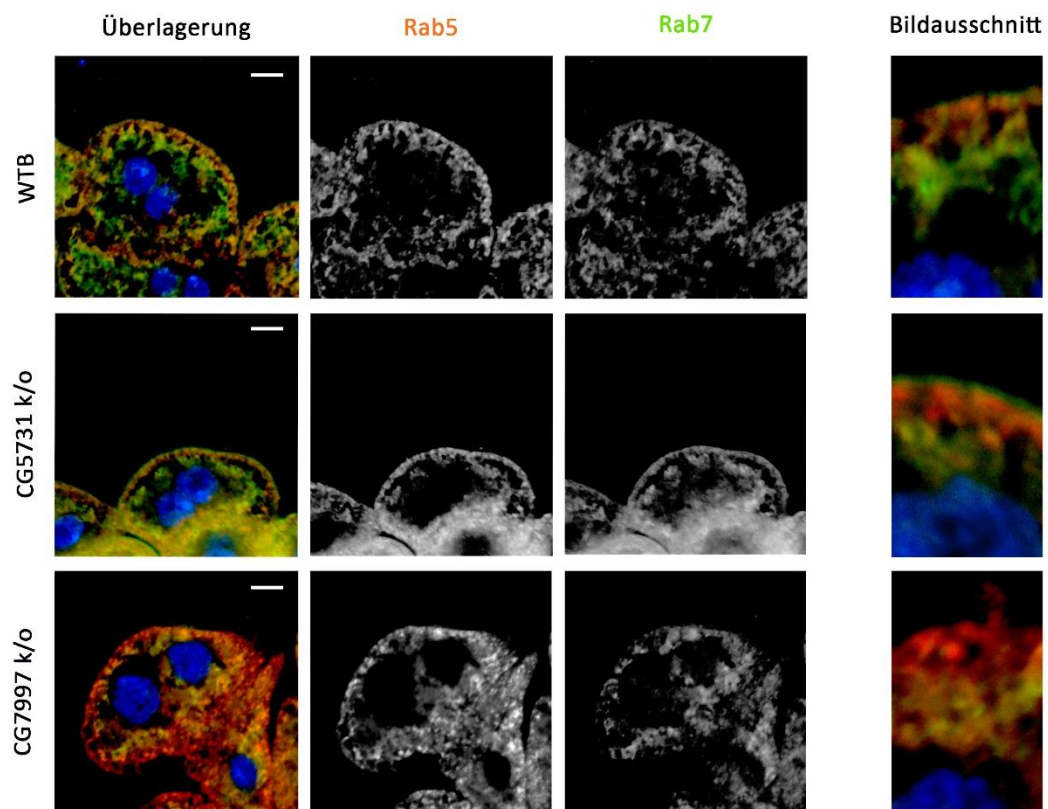


Abbildung 60 Immunfluoreszenzfärbung der endosomalen Kompartimente.

Garlandzellen aus dem dritten Larvenstadium, Größenbalken 5 μm . Besonders im Bildausschnitt rechts ist die Störung der endosomalen Kompartimente in der CG7997 k/o Linie erkennbar. 488 nm: Rab7 (späte Endosomen) 568 nm: Rab5 (frühe Endosomen) 368 nm: Zellkernfärbung mit Hoechst.

Sowohl in der Kontrolllinie, als auch in der CG5731-Knockoutlinie sind die beiden angefärbten endosomalen Kompartimente klar voneinander abgrenzbar (Abbildung 60). Die Rab5-positiven Vesikel befinden sich ausschließlich in der Peripherie der Zelle, die Rab7-positiven Vesikel liegen am äußeren bis mittleren Rand des Zytoplasma.

In der CG7997 Knockoutlinie sind die beiden Kompartimente nicht mehr klar voneinander getrennt. Das Rab5 Signal ist stärker ausgeprägt als bei den anderen beiden Linien, und erstreckt sich vom äußeren Rand der Zelle bis fast an die Zellkerne heran. Das Rab7 Signal ist ein wenig schwächer ausgeprägt und befindet sich in der Mitte der Zelle um die Zellkerne herum. Dies deutet auf eine Störung des endolysosomalen Kompartments hin.

7.2. Autophagozytose

2013 konnten Liebau und Braun et al. in einem Zellkulturmodell zeigen, dass Morbus Fabry in Podozyten eine Störung der Autophagozytosefunktion hervorruft¹²⁸.

Um dieses Phänomen auch im Fliegenmodell zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Garlandzellen des dritten Larvenstadiums gegen die Autophagozytosemarker p62 und Atg8a durchgeführt.

Atg8a ist eines der beiden Homologe von LC3¹²⁹, einem Protein, das im Säuger bei induzierter Autophagozytose in der Membran von sich bildenden Autophagosomen verankert ist¹³⁰. Es bindet an p62 und ist wichtig für die Membranverlängerung und damit die Bildung des Autophagosoms. Ist die Autophagozytose aktiviert, so ändert sich das Verteilungsmuster von Atg8a von einer gleichmäßigen Verteilung im Zytoplasma zu einem punkt- bis ringförmigen Verteilungsmuster¹³⁰.

P62 bindet im Zytoplasma an zu degradierende Stoffe (im Besonderen ubiquitinierte Proteine) und hat eine Bindungsstelle für LC3-II. Es ist daher ein guter Marker für die Induktion der Autophagozytose, den Abbau von Proteinaggregaten und die Hemmung der Autophagozytose. Blockade der Autophagozytose führt zu einer Anhäufung von p62 positiven Vesikeln in der Zelle.

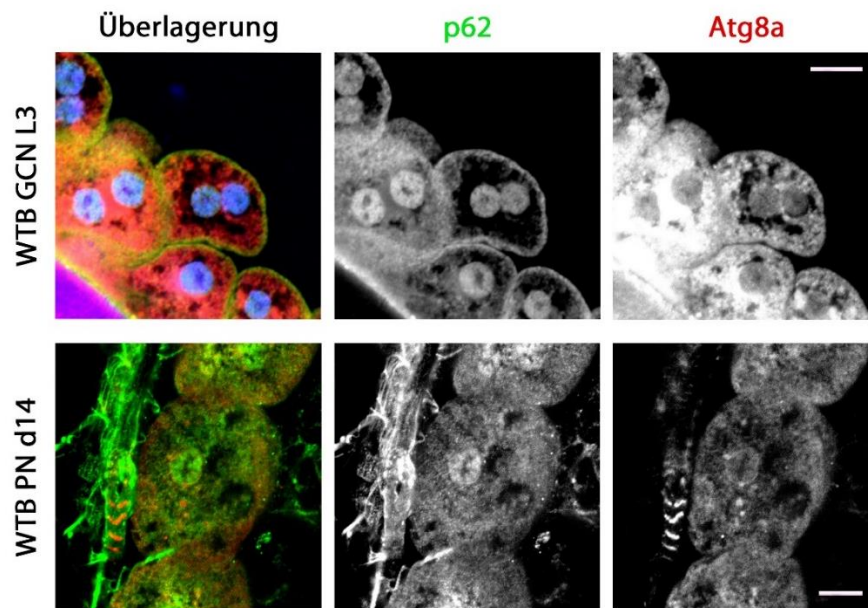


Abbildung 61 Immunfluoreszenzfärbung gegen p62 und Atg8a.

Garlandzellen des dritten Larvenstadiums und adulte, 14 Tage alte PN der Wildtyp Kontrolllinie. Färbung gegen die Autophagozytosemarker p62 und Atg8a. p62: 488 nm, Atg8a: 568 nm, Hoechst: 386 nm. Größenbalken 10 μ m.

Da es in der Literatur bisher noch keine Beschreibung einer solchen Färbung in Nephrozyten gibt, sollen zunächst die Bilder der Wildtyp Kontrolle analysiert werden. Abgebildet sind die Garlandzellen einer Larve im dritten Larvenstadium und die perikardialen Nephrozyten einer adulten, 14 Tage alten Fliege (Abbildung 61).

Die Lokalisation von p62 unterscheidet sich zwischen den untersuchten Zelltypen und Zeitpunkten. In den jungen Garlandzellen lokalisiert es eher in der Peripherie der Zelle, in den älteren perikardialen Nephrozyten ist das Signal gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt. In beiden Zellarten ist auch ein Signal im Kern der Zelle zu sehen.

Atg8a ist in beiden Zellarten zwar leicht fleckig, aber recht gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Die Bildung eines punktförmigen Musters, welches für eine aktivierte Autophagozytose (bspw. durch Hungern oder Stress) sprechen würde, ist hier nicht zu erkennen. Eine Kontrolle der Bindungsspezifität der Antikörper, beispielsweise mittels Färbung von Nephrozyten eines Atg8a/p62 Knockouts, wurde bisher nicht durchgeführt.

Der Vergleich mit den beiden Knockoutlinien ist in Abbildung 62 zu sehen.

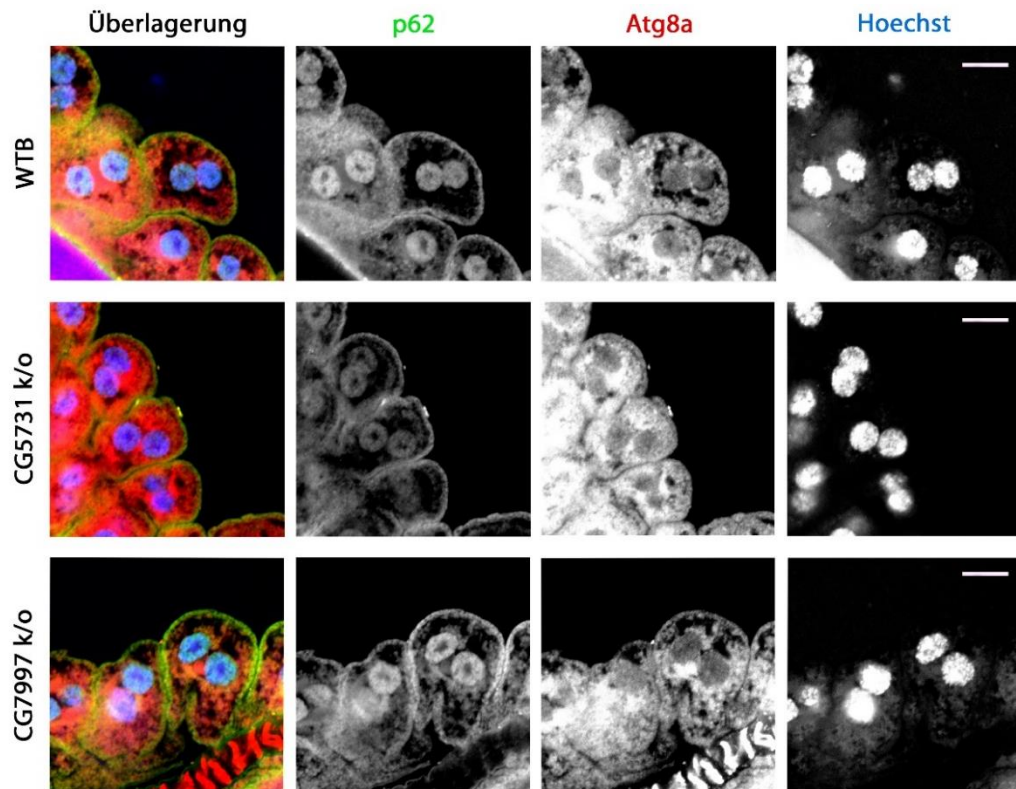


Abbildung 62 Immunfluoreszenzfärbung gegen p62 und Atg8a, Knockout und Kontrolllinien.
In den untersuchten Garlandzellen der Fabry-Knockoutlinien und der Kontrolle ist kein Unterschied des Färbemusters zu erkennen. GCN des 3. Larvenstadiums. p62: 488 nm, Atg8a: 568 nm, Hoechst: 386 nm. Größenbalken 10 μ m.

Weder im Signal von p62 noch von Atg8a ist ein eindeutiger Unterschied zwischen den drei Linien erkennbar. Die Aussage, dass Autophagozytose in Morbus Fabry fehlreguliert ist, war in dem Drosophila Modell bisher nicht reproduzierbar.

8. Nachweis von Globotriaosylceramid

Einer der wichtigsten Biomarker für Morbus Fabry in der Humanmedizin sind erhöhte Globotriaosylceramidwerte in Plasma, Urin und Gewebe^{131,132}.

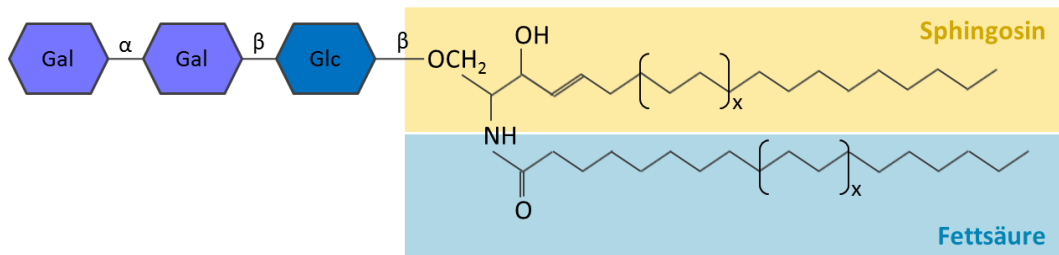


Abbildung 63 Schema der Strukturformel von Gb3.

Die Kohlenstoffketten des Sphingosin- und Fettsäurerests sind in ihrer Länge und Sättigung variabel. Eigene Abbildung.

Globotriaosylceramid (Abbildung 63) ist ein Substrat der α -Galaktosidase A, welches sich durch die mangelnde oder fehlende Enzymaktivität in den Zellen ablagert. Es besteht aus einem Sphingosin- und einem Fettsäurerest, die in ihrer Länge und Sättigung variabel sind, sowie aus einem Dreifachzuckerrest aus zwei Galaktose- und einem Glukosemolekül¹³³.

Um die Übertragbarkeit des *Drosophila*modells auf die Humanmedizin zu demonstrieren, ist der Nachweis von erhöhten Gb3-Werten von großer Wichtigkeit. In dieser Arbeit wurden verschiedene Nachweismethoden genutzt, deren Ergebnisse im Folgenden erläutert werden sollen.

8.1. Immunfluoreszenzfärbung

In der Humanmedizin ist die Immunfluoreszenzfärbung als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Gb3 in Gewebeschnitten beschrieben¹³². Für die Färbung der *Drosophila* Nephrozyten wurde ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Gb3/CD77 verwendet. Da die Akkumulation des Ceramids mit dem Alter zunimmt, wurde mit perikardialen Nephrozyten von 28 Tage alten Fliegen gearbeitet.

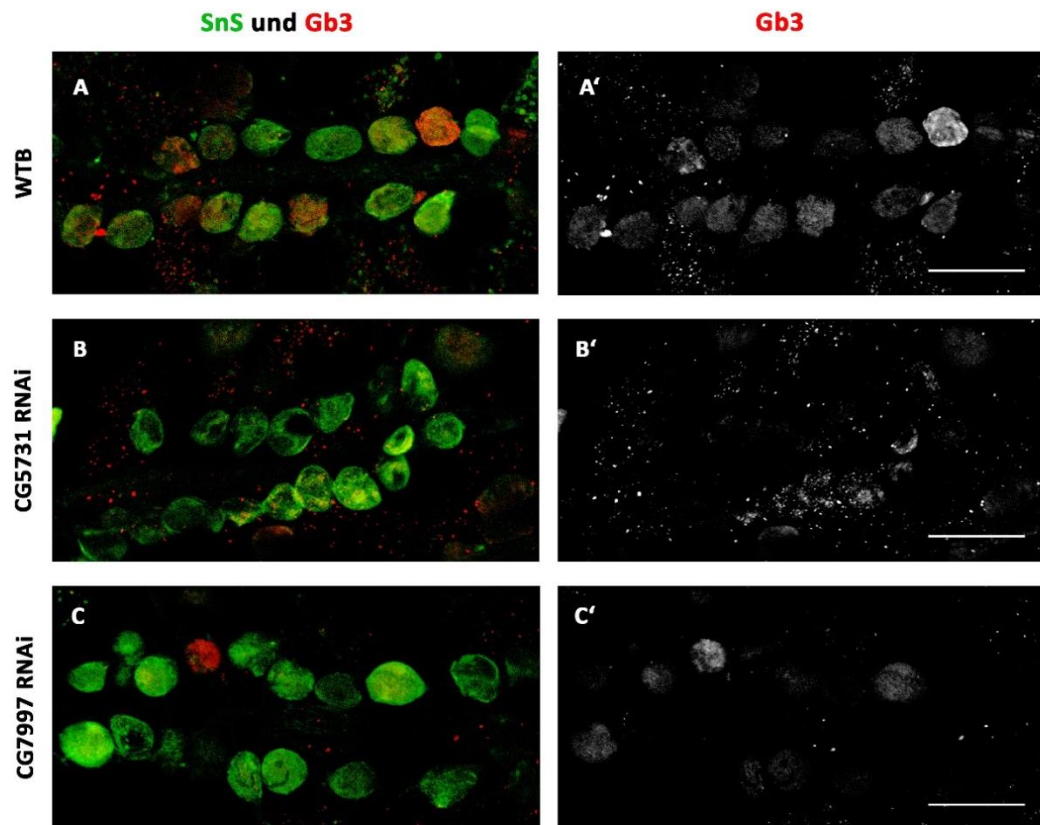


Abbildung 64 Immunfluoreszenzfärbung von Globotriaosylceramid.

Das Anti-Gb3-Signal ist nur mit sehr starken Lasereinstellungen überhaupt erkennbar. Ein Unterschied zwischen den Linien ist nicht reproduzierbar. Dot-Gal4 → UAS-RNAi-Linien, PN d28. (A und A') Dot-Gal4 → WTB (B und B') Dot-Gal4 → UAS-CG5731-RNAi (C und C') Dot-Gal4 → UAS-CG7997-RNAi. SnS: 488 nm, Gb3: 568 nm. Größenbalken 100 µm.

In Abbildung 64 sind die Immunfluoreszenzfärbungen von 28 Tage alten perikardialen Nephrozyten der Dot-Gal4 getriebenen RNAi Linien und ihrer Kontrolle abgebildet. Die Gb3-Färbung ist nur mit einer sehr starken Lasereinstellung überhaupt erkennbar. Das Signal ist nur teilweise in den Nephrozyten lokalisiert, dort auch nur sehr schwach und nicht in jeder Zelle gleich stark. Außerhalb der Zellen sieht man ein unspezifisches, punktförmiges Rauschen.

Ein Unterschied zwischen den RNAi Linien und der Kontrolle ist in diesen Bildern nicht erkennbar, der verwendete Antikörper bindet nur schlecht und unspezifisch.

8.2. Fluoreszenzmarkierte Lektine – Histochemische Färbung

Als Alternative zur Immunfluoreszenzfärbung wurde eine histochemische Färbung mit fluoreszenzmarkierten Lektinen durchgeführt.

Lektine sind hochspezialisierte Proteine, die an Kohlenhydratreste binden. Für die Detektion von Globotriaosylceramid wurde die Untereinheit B des Shiga-like toxin

verwendet, welche an den Dreifachzuckerrest $\alpha\text{Gal}-\alpha\text{Gal}-\beta\text{Glc}$ binden. Die Cy5 markierten Lektine für diesen Versuch wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Winfried Römer bereitgestellt.

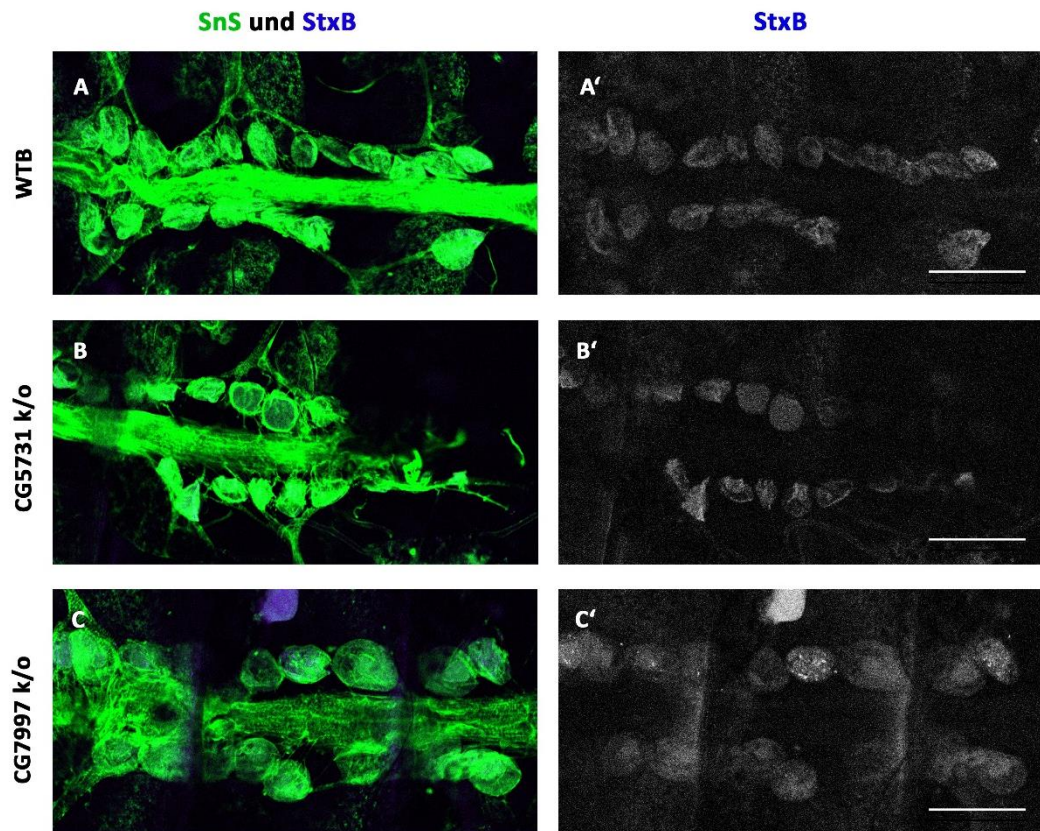


Abbildung 65 Histochemische Färbung von perikardialen Nephrozyten mit Cy5-markierten Lektinen.

Knockouts und Kontrolle, d14. Das Cy5-Signal ist nur schwach ausgeprägt und unterscheidet sich nicht zwischen den drei untersuchten Linien. (A und A') Wildtyp Berlin (B und B') CG5731 k/o (C und C') CG7997 k/o. 488 nm: Anti-SnS; 650 nm: StxB; Größenbalken 100 μm .

Zunächst wurden die perikardialen Nephrozyten von 14 Tage alten Fliegen der Knockoutlinien und der Wildtypkontrolle präpariert und gefärbt (Abbildung 65). Das Signal von StxB war allerdings sehr schwach, was an dem starken Hintergrundrauschen deutlich erkennbar ist. Ein Unterschied zwischen Knockouts und Kontrolle war nicht zu erkennen.

Auch hier erhoffte man sich einen stärkeren Phänotyp am 28. Lebenstag der Fliegen.

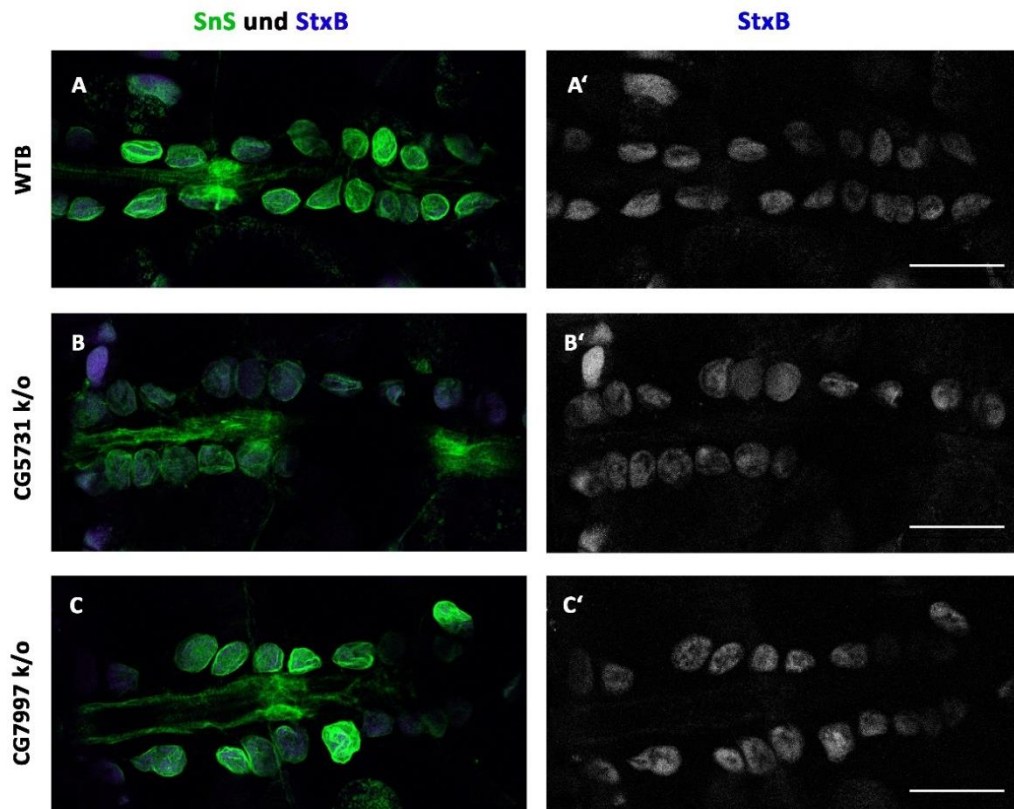


Abbildung 66 Histochemische Färbung von perikardialen Nephrozyten mit Cy5-markierten Lektinen.

Knockouts und Kontrolle, d28. Auch am 28. Lebenstag ist kein Unterschied zwischen den drei Linien erkennbar. Insgesamt ist das Cy5-Signal jedoch in allen Linien stärker ausgeprägt. (A und A') Wildtyp Berlin (B und B') CG5731 k/o (C und C') CG7997 k/o. 488 nm: Anti-SnS; 650 nm: StxB; Größenbalken 100 μ m.

Die Färbung der 28 Tage alten perikardialen Nephrozyten zeigt ein deutliches, in den Zellen lokalisiertes Signal (Abbildung 66). Ein spezielles Verteilungsmuster ist nicht zu erkennen, StxB bindet gleichmäßig über die gesamte Zelle. Das Gewebe um die Nephrozyten herum (Herzschlauch, Muskulatur, Fettgewebe) hat größtenteils ein deutlich schwächeres Signal.

Auch hier ist kein klarer Unterschied zwischen den drei Linien erkennbar, das Cy5-Signal ist in allen angefertigten Präparaten gleich stark.

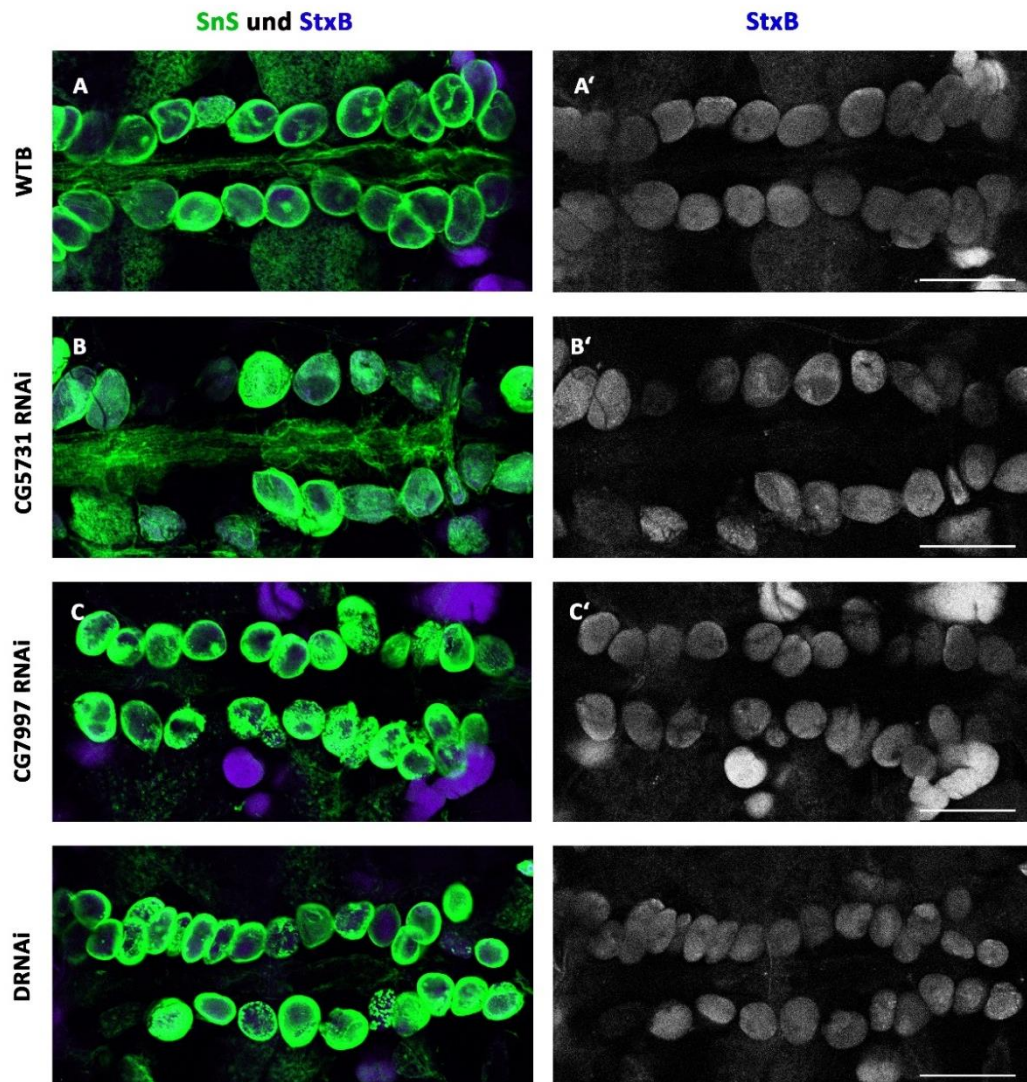


Abbildung 67 Histochemische Färbung von perikardialen Nephrozyten mit Cy5-markierten Lektinen.

Dot-Gal4 getriebene RNAi-Linien und ihre Kontrolle, d28. Auch die RNAi-Linien unterscheiden sich nicht in der StxB-Cy5-Signalintensität. (A und A') Dot-Gal4 → Wildtyp Berlin (B und B') Dot-Gal4 → UAS-CG5731-RNAi (C und C') Dot-Gal4 → UAS-CG7997-RNAi. 488 nm: Anti-SnS; 650 nm: StxB; Größenbalken 100 µm

Auch die RNAi Linien wurden am 28. Lebenstag mit dieser Methode untersucht (Abbildung 67). Das Signal ist gut zu erkennen und klar in den Nephrozyten lokalisiert. Auch hier ist die Färbung gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt und das umliegende Gewebe ist größtenteils nur schwach gefärbt.

Allerdings ist auch zwischen den verschiedenen RNAi Linien kein Unterschied in der Signalintensität erkennbar.

8.3. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie ist eine sensitive Methode zum Nachweis von Glykosphingolipiden, besonders auch in Kombination mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse¹³⁴.

Die Lipide aus 28 Tage alten Fliegen der Knockoutlinien und der Wildtypkontrolle wurden nach der Methode von Bligh und Dyer¹³⁵ extrahiert und auf eine silicabeschichtete DC-Platte aufgetragen.

Zunächst wurde eine Detektion mit dem unspezifischen Färbemittel Anisaldehyd durchgeführt um zu verifizieren, ob die Auftrennung der Lipide wie erwartet funktioniert hat. Anschließend wurde ein spezifischer Overlay-assay mit biotinyliertem Shiga-like toxin Untereinheit B (bStxB) durchgeführt (Abbildung 68)

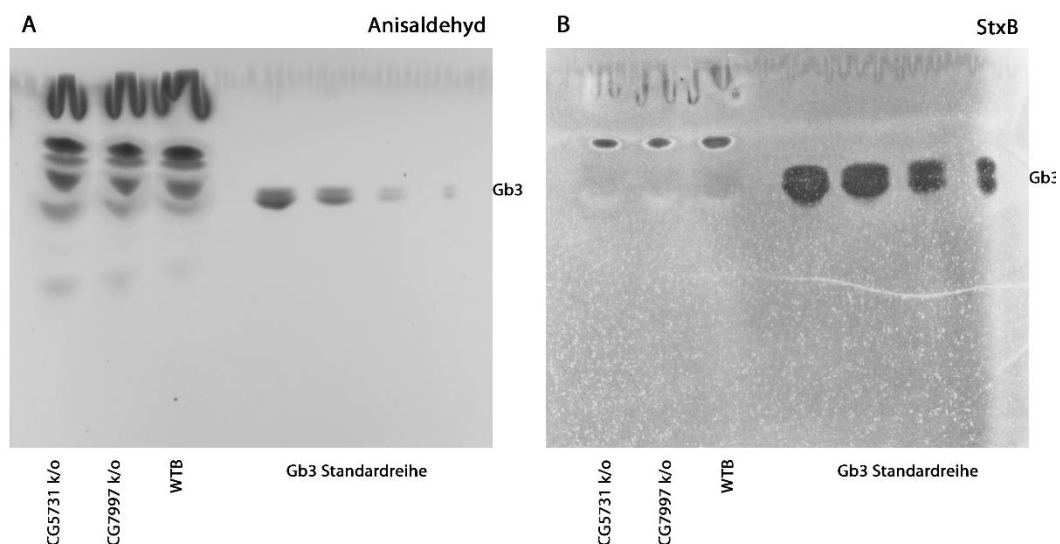


Abbildung 68 Dünnschichtchromatographie d28 Mutanten und Kontrolle.

Die Auftrennung der Lipide aus den Extrakten ist in A dargestellt. Die spezifische Detektion mit StxB zeigte keine Banden an der erwarteten Stelle. (A) Detektion mit Anisaldehyd und (B) Detektion mit bStxB. Die Standardreihe wurde mit Gb3 aus porcinen Erythrozyten angefertigt.

Die Detektion mit Anisaldehyd bewies, dass in den Lysaten genug Lipide für eine Auswertung des Versuchs enthalten waren. Auch die Auftrennung der Lipide zeigte das erwartete Muster.

Allerdings ergab der Overlay-assay mit bStxB keine Banden auf der erwarteten Höhe. Die Standardreihe mit Gb3 aus porcinen Erythrocyten hingegen zeigte ein deutliches Signal.

Bisher konnte der Stoff Globotriaosylceramid mit den gängigen, hier aufgeführten Methoden in *Drosophila melanogaster* nicht nachgewiesen werden.

9. RNAseq

Um Informationen zur Genexpression auf mRNA Ebene zu erhalten, wurde eine Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq) aus Fliegen der Knockoutlinie und der Kontrolle durchgeführt.

RNA-Seq ist eine moderne, hochauflösende Methode, welche auf dem Prinzip der Sequenzierung der nächsten Generation („next-generation sequencing“) basiert^{136,137}. Pro Datensatz wurden 100 Fliegen des gleichen Genotyps lysiert und ausgewertet, die Gesamtzahl der Datensätze beträgt $n=1$. Das Alter der Fliegen betrug 0 – 7 Tage, es wurden zu gleichen Teilen männliche und weibliche Tiere verwendet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC (Konstanz), die Auswertung der Daten wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Nicola Wanner durchgeführt.

Abbildung 69 zeigt das Expressionsmuster der Gene CG7997 und CG5731 in den beiden Knockoutlinien sowie der WTB Kontrolle. Das Gen CG7997 wird in der CG7997-Knockoutlinie ab dem 3. Exon fast nicht mehr in mRNA übersetzt. Vermutlich erfolgte an dieser Stelle die Insertion des Transposonelements, und die Transkription wird dadurch unterbrochen. Die CG5731-Knockoutlinie hat ein dem Wildtyp Berlin ähnelndes Expressionsmuster. (Abbildung 69 A)

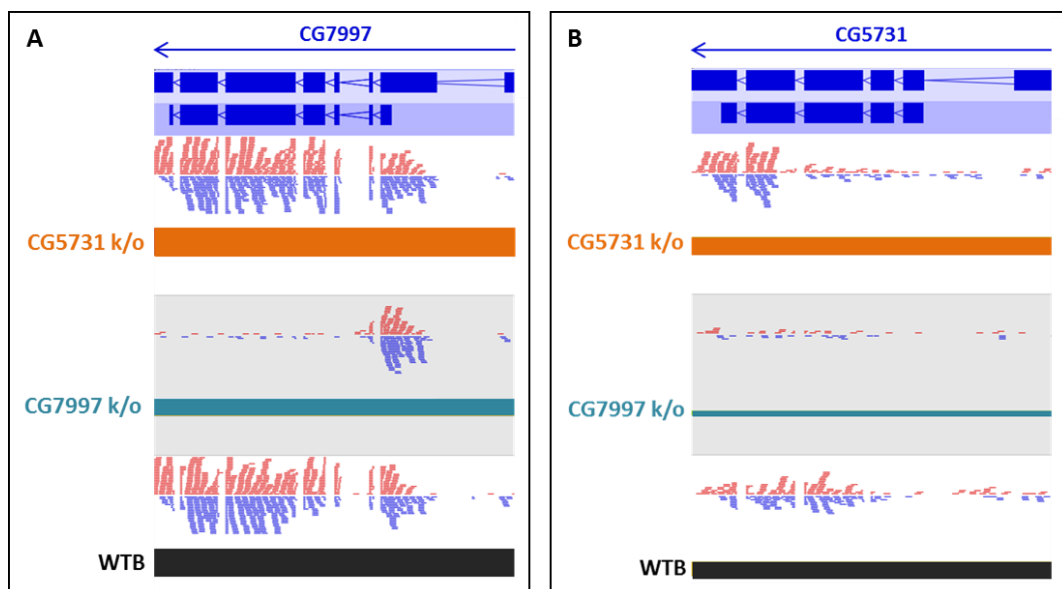


Abbildung 69 Repräsentation der mRNA am Fliegentranskriptom.

Gezeigt sind die Transkriptome von (A) CG7997 und (B) CG5731. Die Grafik wurde mit dem Programm SeqMonk von Barbraham Bioinformatics erstellt, die Höhe der Balken repräsentiert den Log2 RPM (reads per million). In der CG5731-Knockoutlinie findet keine Expression von CG5731 mehr statt. In der CG7997-Knockoutlinie findet praktisch keine Expression der Gene CG5731 und CG7997 statt.

Das Gen CG5731 hat schon in der Kontrolle eine geringere Expression im Vergleich zu CG7997. In der CG5731 Knockoutlinie werden nur die letzten beiden Exons in mRNA übersetzt, der Rest des Gens wird fast nicht exprimiert. Interessanterweise hat jedoch auch die CG7997 Knockoutlinie für CG5731 nur sehr wenige Reads.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden putativen Knockouts auf mRNA Ebene keine vollständige Expression ihrer beiden Proteine zeigen. Damit ist der Knockoutnachweis auf Transkriptomebene erbracht, allerdings zeigt die CG7997 Knockoutlinie zusätzlich praktisch keine Expression des Gens CG5731. Ob die Ursache dafür ein fehlinsertiertes Transposon auf DNA Ebene oder die Herabregulation als Folge des CG7997 Knockouts ist, kann anhand dieser Daten nicht geklärt werden.

Im Folgenden soll das Transkriptom der CG7997-Knockoutlinie mit dem der Wildtypkontrolle verglichen werden, um zusätzliche Informationen über die Auswirkungen dieses Knockouts auf die Fliegen zu erhalten.

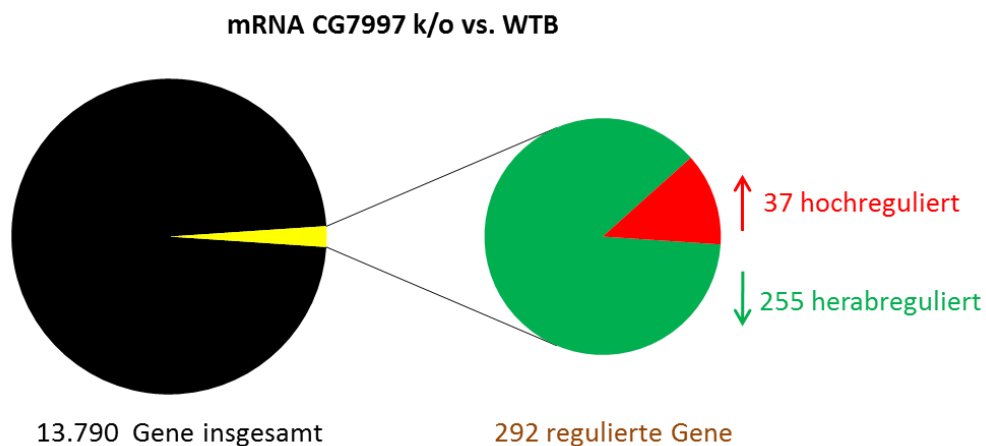


Abbildung 70 Kreisdiagramm der Genregulation von CG7997 k/o im Vergleich zur Kontrolle.

In der CG7997-Knockoutlinie sind im Vergleich zum Wildtyp mehr Gene herab- als hochreguliert. Schwarz: gesamtes Genom; Gelb: regulierte Gene; Grün: in CG7997 k/o herabregulierte Gene; Rot: in CG7997 k/o hochregulierte Gene.

Insgesamt wurde die mRNA von 13.790 Genen erkannt und dem Referenzgenom von *Drosophila melanogaster* (Version Dm3^{4,138}) zugeordnet. Davon sind in der CG7997 Knockoutlinie 292 Gene hoch- beziehungsweise herabreguliert (Abbildung 70). Auffällig ist, dass mit 255 Genen insgesamt deutlich mehr Gene herab- als hochreguliert sind (37 insgesamt).

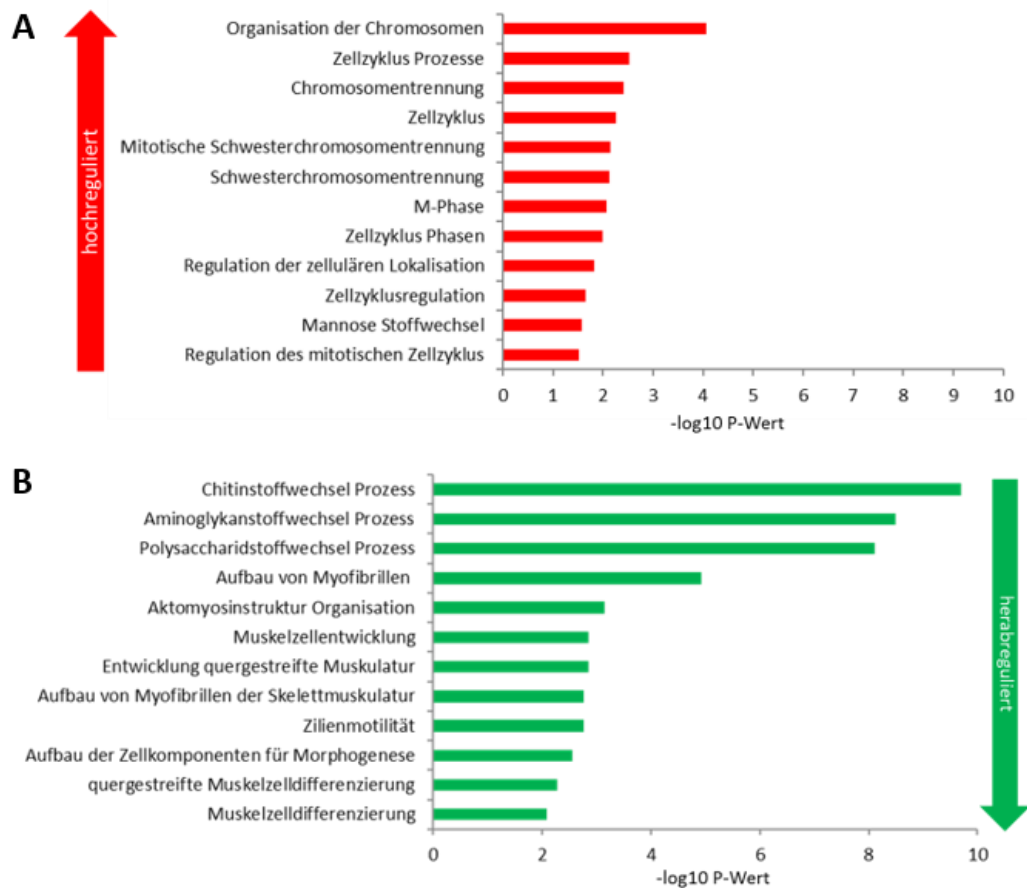


Abbildung 71 Regulierte Stoffwechselwege (GO Terms) von CG7997 k/o im Vergleich zur WTB-Kontrolle.

In der CG7997-Knockoutlinie sind im Vergleich zum Wildtyp Berlin besonders Gene, die für Zellteilung und Zellzyklus zuständig sind, hochreguliert. Herabreguliert sind verschiedene Stoffwechselwege, sowie Mechanismen, die dem Skelettmuskelaufbau dienen. (A) hochregulierte Gengruppen (B) herabregulierte Gengruppen.

Eine Analyse der regulierten Gene mit David Bioinformatics Resources 6.8, anhand ihrer Funktion zusammengefasst in Gruppen (Genontologie, biologische Prozesse), ist in Abbildung 71 dargestellt. Hochreguliert sind besonders Gene, die für Zellteilung und Zellzyklus zuständig sind. Herabreguliert sind verschiedene Stoffwechselwege (Chitin, Aminoglykan und Polysaccharidstoffwechsel), sowie Mechanismen, die dem Skelettmuskelaufbau dienen.

Zuletzt wurde noch der Stoffwechselweg analysiert, in dem der biologische Hauptmarker für Morbus Fabry synthetisiert und abgebaut wird: Die Globoserie des Sphingolipidstoffwechsels (Abbildung 72).

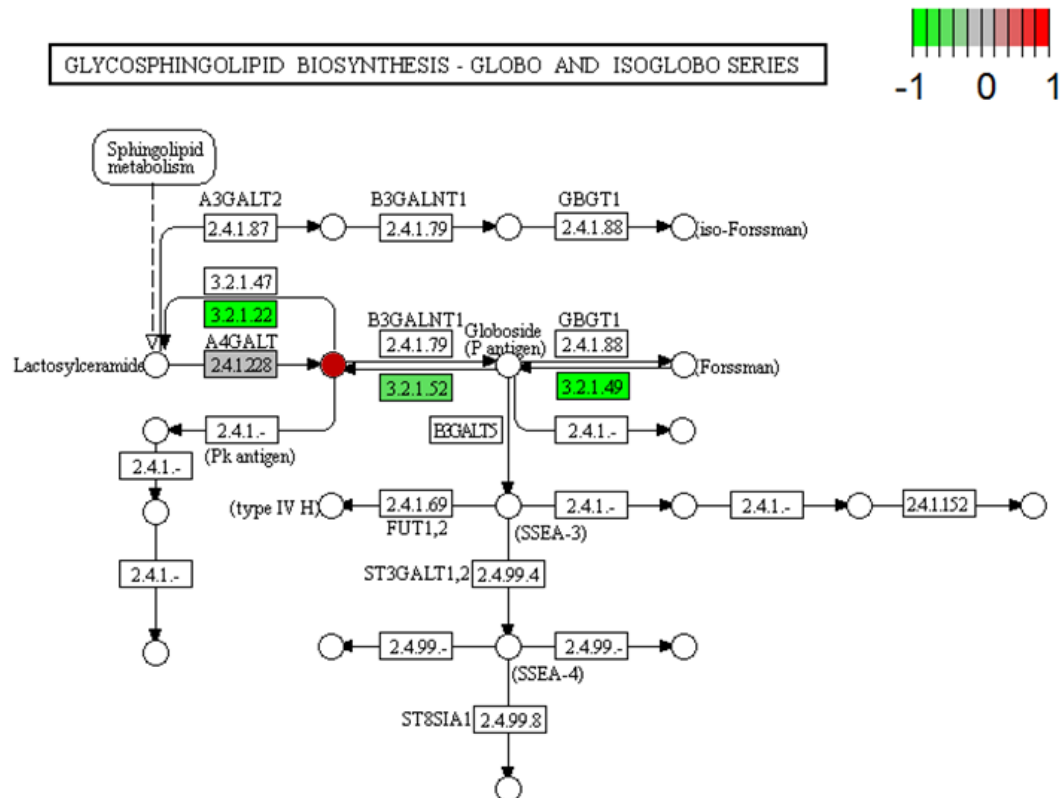


Abbildung 72 Regulation der Enzyme des Stoffwechselweges „Sphingolipidstoffwechsel – Globoserie“.

Grüne Felder sind herabregulierte Gene (Skala = \log_2 foldchange), der rote Punkt repräsentiert Gb3. Graue Felder sind Enzyme, die in *Drosophila* ein Sequenzhomolg haben. Weiße Felder sind Enzyme, für die kein Sequenzhomolog in *Drosophila* bekannt ist. Grafik modifiziert nach KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, www.genome.jp/kegg/pathway.html, ©Kanehisa Laboratories) Signalweg #00603, modifiziert mit Pathview¹³⁹.

Die grünen Felder repräsentieren Enzyme, deren Sequenzhomolog in *Drosophila* bekannt ist und welche im CG7997 Knockout herabreguliert waren. Graue Felder sind Enzyme, deren Sequenzhomolog bekannt ist, die aber nicht reguliert sind. Bei weißen Feldern ist kein Sequenzhomolog bekannt.

Das Sequenzhomolog für α GAL (3.2.1.22) wird bei Keggpathway mit CG7997 angegeben und ist in der Knockoutlinie, wie zuvor gezeigt, herabreguliert. Die anderen beiden herabregulierten Gene sind β -N-Acetylhexosaminidase (3.2.1.52) und α -N-Acetylgalactosaminidase (3.2.1.49, α NAGAL, wird bei Keggpathway mit CG5731 angegeben), welche beide in Richtung der Synthese von Gb3 katalysieren. Durch die Herabregulation der beiden Gene wird also insgesamt weniger Gb3 produziert. Die Sequenzhomologe des restlichen Pathway sind nicht bekannt.

IV. DISKUSSION

Morbus Fabry ist mit einer Inzidenz von 1/40.000 bis 1/170.000 die zweithäufigste lysosomale Speicherkrankheit weltweit nach Morbus Gaucher. Das Fehlen eines geeigneten *in vivo* Modells und die Mängel der bestehenden *in vitro* Modelle, besonders im Bereich der Nephrologie, verdeutlichen die Notwendigkeit für ein neues, alternatives Tiermodell. In dieser Arbeit sollte ein solches Tiermodell mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* etabliert werden und dessen Eignung für die nephrologischen Fragestellungen der Pathogenese der Fabry Nephropathie getestet werden.

Morbus Fabry beruht auf einer Mutation im Gen GLA (Xq22.1), welches für das lysosomale Enzym α -Galaktosidase A (α GAL) codiert. In einer ersten *in silico* Recherche wurden die homologen Gene dieses humanen Gens in *Drosophila melanogaster* identifiziert und anschließend deren Genprodukte in ihrer dreidimensionalen Form analysiert.

1. Die *Drosophila* Sequenzhomologe der α -Galaktosidase A

GLA hat in der Fliege zwei Sequenzhomologe: CG5731 und CG7997, jeweils mit einer Übereinstimmung der Sequenzen von ca. 45%. Betrachtet man die von dem Programm SWISSmodel^{116,115,114,113} vorausgesagte dreidimensionale Struktur der beiden Fliegenenzyme, so fällt die große strukturelle Ähnlichkeit zu dem humanen Enzym α GAL auf. Fast alle Strukturelemente sind in den drei Enzymen praktisch deckungsgleich in ihrer Lage, Länge und Position im Raum.

Neben α GAL wird von SWISSmodel noch ein zweites humanes Enzym, α -N-Acetyl-D-Galactosaminidase (α NAGAL, EC. 3.2.1.49), als Sequenzhomolog von CG5731 angegeben. Auch dieses Enzym ist den beiden Fliegenenzymen in seiner dreidimensionalen Struktur sehr ähnlich.

α NAGAL ist ein Sequenzhomolog von α GAL, dessen Exone sowohl im humanen als auch im murinen Genom an den selben Positionen wie im GLA Gen von Intronen unterbrochen werden. Daher wird vermutet, dass beide Gene evolutionär den gleichen Genvorläufer haben¹¹⁸. Die dreidimensionale Struktur dieses Enzyms wurde 2009 mittels Röntgenkristallographie ermittelt¹¹⁹ und die Ähnlichkeit zu α GAL festgestellt. Das aktive Zentrum unterscheidet sich jedoch in einer Aminosäure von dem der α GAL, woraus sich eine geringere Substratspezifität ergibt. Wo α GAL sehr spezifisch für die Abspaltung von α -Galactoseresten ist, ist

α NAGAL zusätzlich in der Lage, die N-acetylierte Form von α -Galactose (α GalNac) abzuspalten. Eine Mutation der α NAGAL führt zu der autosomal rezessiv vererbten lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Schindler¹⁴⁰, die besonders bei jungen Patienten von einer massiven, progressiven Neurodegeneration geprägt ist^{141,142}.

Bei näherer Betrachtung der aktiven Zentren dieser vier Enzyme fällt sofort die große Ähnlichkeit der Konformation auf. Zwei der fünf beteiligten Aminosäurereste sind sogar komplett identisch. Die sterische Hinderung durch die Aminosäure Glutamin, die für die hohe Substratspezifität von α GAL sorgt, ist sowohl in α NAGAL, als auch in den beiden Fliegenenzymen nicht vorhanden. Ihre Bindungstaschen sind im Vergleich zu α GAL offener und weniger spezifisch.

Die beiden Fliegenenzyme CG5731 und CG7997 gleichen also sowohl in ihrer dreidimensionalen Struktur, als auch in der Konformation ihres aktiven Zentrums der humanen α GAL. Ihre Substratspezifität wird allerdings anhand des vorhergesagten Modells geringer eingeschätzt als die der α GAL. Trotzdem können aus bioinformatischer Sicht beide Enzyme die hydrolytische Abspaltung von α -Galactose katalysieren und sind damit potenzielle Kandidaten für ein Fabry-*Drosophila*modell. Daher wurde in dieser Arbeit mit durch PiggyBac Transposoninsertion erstellten Knockoutlinien und RNAi Linien beider Gene gearbeitet, und zusätzlich eine kombinierte RNAi Linie mit beiden Genen zusammengekreuzt.

Um diese Fliegenlinien experimentell anhand ihrer funktionellen α -Galactosidase Aktivität zu charakterisieren, und die Übertragbarkeit der Fliegenenzymaktivität auf die Humanmedizin zu demonstrieren, konnte ein Enzymaktivitätstest aus der humanmedizinischen Diagnostik für *Drosophila* etabliert und durchgeführt werden.

2. Der Enzymaktivitätstest als erste Charakterisierung

Das verwendete Substrat 4-Methylumbelliferyl- α -D-galactopyranosid kann sowohl von α GAL als auch von α NAGAL umgesetzt werden. Da bei Morbus Fabry allerdings nur die α GAL Aktivität eingeschränkt ist, wurde dem Substratpuffer ein Hemmstoff für α NAGAL zugesetzt, um das Testergebnis nicht zu verfälschen.

Alle Knockout und RNAi-Linien zeigten eine signifikant erniedrigte α -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zu der Wildtyp Kontrolllinie. Die Aktivität der Knockout Linien korrelierte mit der der zugehörigen RNAi Linien.

Insgesamt war die Enzymaktivität der CG7997 Linien deutlich niedriger als die der CG5731 Linien. Entgegen der Erwartung hatte die kombinierte RNAi Linie keine geringere Enzymaktivität als die beiden einzelnen RNAi Linien, sondern befand sich in einem Bereich ähnlich der CG5731 RNAi Linie. Da eine Genotypisierung dieser Linie nicht durchgeführt wurde, lässt dieses Versuchsergebnis verschiedene Interpretationen zu. Möglicherweise entspricht der tatsächliche Genotyp dieser Linie nicht dem erwarteten Genotyp, oder die Linie hat keinen einheitlichen Genotyp. Außerdem wird die Gesamt-Gal4-Menge in dieser Linie auf zwei UAS-RNAi-Sequenzen verteilt, daher kann an jeder der beiden Sequenzen nur jeweils die Hälfte der Gal4 Transkriptionsfaktoren binden wie in den isolierten RNAi-Linien. Dies könnte ein weiterer Grund für die höhere Enzymaktivität dieser Linie sein. Alles in allem hatte diese Linie nicht die erwartete, deutlich niedrigere Enzymaktivität im Vergleich zu den isolierten RNAi-Linien und ist daher für ein Fabry-*Drosophila*-Modell nicht besser geeignet als die isolierten Linien.

Zusammengefasst hat die CG7997 Knockout bzw. Knockdownlinie die niedrigste α -Galaktosidaseaktivität aller untersuchten Linien. Dieses Versuchsergebnis beweist, dass das Enzym CG7997 am stärksten die Funktion der α GAL in der Fliege übernimmt. Trotzdem zeigten die CG7997 Linien eine Restenzymaktivität, die höchstwahrscheinlich auf die Aktivität von CG5731 zurück geführt werden kann. Möglicherweise wäre das optimale Fabry-*Drosophila*-Modell, zumindest in Bezug auf die Enzymaktivität, mit einem kombinierten Knockout von CG5731 und CG7997 zu erreichen. Ein solcher Doppelknockout ist jedoch wesentlich aufwändiger zu erstellen als die kombinierte RNAi-Linie, da CG5731 und CG7997 auf dem selben Chromosom liegen. Daher ist eine Kombination des Knockouts durch Kreuzen der kommerziell erhältlichen Knockoutlinien nur mittels genetischer Rekombination¹⁴³ möglich, ein Prozess der sehr zeitaufwändig ist. Daher wurde auf diesen Schritt vorerst zu Gunsten anderer Versuche verzichtet.

3. Die Analyse der Ultrastruktur der *Drosophila* Nephrozyten mittels TEM

In der mit Morbus Fabry einhergehenden Nephropathie finden sich die stärksten Gb3-Ablagerungen und Zellschäden in den Podozyten. Da Podozyten postmitotische Zellen sind, haben sie im Gegensatz zu beispielsweise Tubulusepithelzellen eine geringere Fähigkeit zur Regeneration¹⁴⁴. Dadurch kann sich die schädliche Wirkung der fehlenden α GAL-Aktivität über einen viel längeren Zeitraum auf die Zellen auswirken, ohne dass diese sich der Auswirkung entziehen können. Ob die schädliche Wirkung eine direkte Folge der Gb3-Ablagerungen ist, oder ob diese eine reine Begleiterscheinung sind, ist bis heute nicht geklärt. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen Podozyten die für Morbus Fabry typischen, lamellären Einschlusskörperchen, bei denen es sich um sekundäre Lysosomen handelt¹⁴⁵. Außerdem sind die Gb3 Ablagerungen teilweise auch als elektronendichte, rundliche Agglomerate im Zytoplasma der Zellen zu erkennen.

Auch die „fliegenden Podozyten“⁵¹ der fünf Fliegenlinien wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie charakterisiert und auf diese elektronenmikroskopischen Veränderungen untersucht.

Die Untersuchung der 28 Tage alten Nephrozyten der Knockoutlinien ergab hauptsächlich einen starken Alterungsphänotyp mit beginnenden Apoptoseanzeichen. Am 14. Lebenstag zeigten die Kontrolle und die CG5731 Knockoutlinie einen für den Wildtyp klassischen Aufbau der Nephrozyten. Der CG7997-Knockout hingegen zeigte eine deutliche, unspezifische Schädigung der Nephrozyten. Auffällig war außerdem, dass das Zytoplasma zahlreiche dünnwandige, aufgequollen erscheinende Vesikel enthielt und die Schlitzmembran weniger ausgeprägt war als in der Kontrolle. Am 28. Lebenstag war das Zellinnere dann fast vollständig zerstört. Auch in den SEM-Aufnahmen der PN war dieser Effekt eines „leeren“ Zytoplasmas von außen sichtbar. Dies lässt darauf schließen, dass ein Knockout des Enzyms CG7997 eine eindeutige Schädigung der Nephrozyten nach sich zieht, wohingegen der Knockout von CG5731 keine transmissionselektronenmikroskopisch sichtbaren Folgen hat. Worin genau diese schädigende Wirkung begründet liegt, ist anhand der angefertigten Bilder schwer zu erkennen. Es ist nicht eindeutig zuzuordnen, ob die Vesikel endo-, lyso-, oder autophagosomalen Ursprungs sind, oder ob diese dem Golgi Apparat entspringen. Ohne eine ImmunoGold Antikörperfärbung gegen

verschiedene Vesikelmarker kann die Identität der Vesikel nicht eindeutig bestimmt werden. Klar ist jedoch, dass offensichtlich durch eine mangelnde α GAL Aktivität eine Störung des vesikelmedierten Transport- und Stoffwechselsystems der Nephrozyten ausgelöst wird. Auch die Größenunterschiede der Nephrozyten der CG7997-Knockoutlinie in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen können auf die Akkumulation von Vesikeln innerhalb der Zelle und damit ein Anschwellen der Nephrozyten erklärt werden. Möglicherweise wäre eine transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Nephrozyten am 1. Lebenstag interessant, da die Schäden am 14. Lebenstag schon sehr weit fortgeschritten sind. So erhielte man Informationen über das Frühstadium und den Verlauf dieses Phänomens.

Obwohl ein Phänotyp, wie er aus humanen Nierenbiopsien bekannt ist, in den untersuchten Zellen und zu den untersuchten Zeitpunkten nicht zu erkennen war, geben die angefertigten TEM-Bilder der Knockoutlinien interessante neue Hinweise auf eine mögliche Pathogenese der Fabry'schen Erkrankung.

Die RNAi-Linien wurden mit Hilfe des nephrozytenspezifischen Treibers Dot-Gal4 evaluiert. Sie zeigten bereits am 14. Lebenstag sowohl in der CG5731-RNAi-Linie als auch in der CG7997-RNAi-Linie einen eindeutigen fabryspezifischen Phänotyp mit den typischen elektronendichten, lamellären Einschlusskörperchen. Beide Linien zeigten außerdem ein hohes Maß an aufgequollenen, teilweise lysierten Mitochondrien. Der Aufbau der Cristae der inneren Mitochondrienmembran war gestört, die mitochondriale Matrix war weniger dicht und teilweise war die äußere Mitochondrienmembran zerstört. All diese Veränderungen deuten auf eine Mitochondriendegeneration hin.

In der mit Dot-Gal4 gekreuzten Wildtyp Kontrolle fallen allerdings, wenn auch weniger prominent, ähnliche Mitochondriendefekte auf. Hier sind die Mitochondrien vermehrt in Gruppen aneinandergelagert und scheinen teilweise sogar zu fusionieren. Auch diese Veränderungen können auf eine Mitochondriendegeneration hinweisen. Da diese Effekte nur in den mit Dot-Gal4 getriebenen Linien auftreten, sollten die Nephrozyten von homozygoten Dot-Gal4 Fliegen transmissionselektronenmikroskopisch untersucht und mit diesen Bildern verglichen werden. Treten dort ähnliche Defekte auf, kann auf einen anderen Treiberstamm ausgewichen und die Untersuchungen wiederholt werden.

Ist dieses Versuchsergebnis jedoch auf den Knockdown der beiden Fabrygene zurückzuführen, so sollten weitere Versuche zum Energiestoffwechsel und der

Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durchgeführt werden. Auch eine Untersuchung der Knockoutlinien diesbezüglich ist sinnvoll, da so eventuell zusätzliche Informationen zu der Degeneration der Nephrozyten des CG7997-Knockouts gewonnen werden können.

Am 28. Lebenstag zeigte besonders die CG7997-RNAi-Linie einen massiven fabryspezifischen Phänotyp. Noch deutlich stärker als am 14. Lebenstag waren im Zytoplasma zahlreiche elektronendichte, lamelläre Einschlusskörperchen zu sehen. Die Schlitzmembran war stark verändert und das Zytoplasma der Zellen aufgelockert. Eine Akkumulation von Gb3 in Form von elektronendichten, rundlichen Agglomeraten war jedoch in den untersuchten Zellen nicht zu erkennen. Der Mechanismus der Akkumulation sekundärer Lysosomen in Form von „Zebrabodies“ scheint also evolutionär so konserviert, dass sich die Ultrastruktur von humanen Nierenbiopsien und *Drosophila* Nephrozyten des CG7997 Knockdowns praktisch gleichen. Dieses Versuchsergebnis unterstreicht erneut die Übertragbarkeit des *Drosophila* Modells auf den Säuger.

Die kombinierte RNAi-Linie zeigte zwar einen ähnlichen Phänotyp mit Zebrabodies, allerdings weniger ausgeprägt als die CG7997-RNAi-Linie. Die Nephrozyten der untersuchten Zellen glichen in ihrer Ultrastruktur eher der CG5731-RNAi-Linie. Dieser elektronenmikroskopische Phänotyp deckt sich mit den bisherigen Untersuchungen zur α Galaktosidase Aktivität dieser Linie.

Auffällig ist allerdings, dass sich der ultrastrukturelle Phänotyp der CG7997-Knockoutlinie nicht mit dem der CG7997-RNAi-Linie deckt. Während im Knockout eher eine unspezifische Degeneration der Nephrozyten mit Akkumulation von bisher nicht weiter definierten Vesikeln zu sehen ist, zeigt die RNAi-Linie in den ausgewerteten Bildern einen klassischen, fabryspezifischen Phänotyp.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die Methode „Transmissionselektronenmikroskopie“ immer nur einen sehr kleinen Einblick in das ultrastrukturelle Geschehen ermöglicht. Pro Genotyp wird meist nur eine Fliege ausgewertet, und von dieser Fliege auch nur durchschnittlich drei Nephrozyten. Gibt es eine Variabilität des Phänotyps innerhalb des Genotyps, so kann es leicht zu Fehlinterpretationen kommen. Diese können durch die Anfertigung und Auswertung weiterer Bilder vermieden und der Phänotyp klarer definiert werden. Da die Transmissionselektronenmikroskopie jedoch mit einem großen zeitlichen und personellen Aufwand verbunden ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf das Anfertigen weiterer Bilder zugunsten von anderen Versuchen

verzichtet. Trotzdem zeigen beide CG7997-Linien eine eindeutige Schädigung der Nephrozyten, und auch eine Variabilität des Phänotyps der mangelnden α GAL Aktivität kann neue, interessante und vielversprechende Hinweise auf die Pathogenese von Morbus Fabry geben.

Einer dieser weiteren Versuche war die Untersuchung der genauen Lokalisation von CG7997 innerhalb der Zelle mit einer endogen mit GFP (green fluorescent protein) markierten Reporterlinie. Die konfokalmikroskopischen Bilder von perikardialen Nephrozyten zeigten eine deutliche Expression des Enzyms in dieser Zellgruppe, besonders auch im Gegensatz zum umliegenden Gewebe (Herzschlauch, Muskulatur, Fettgewebe), welches praktisch kein Signal zeigte. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit dieses Enzyms im Stoffwechsel dieser Zellen. Die Immunfluoreszenzfärbungen zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation in Garlandzellen zeigte, dass das Enzym sowohl in frühen, wie auch in späten Endosomen lokalisiert. Um diese Lokalisation noch genauer zu charakterisieren, könnten zusätzlich noch Marker für Lysosomen (Bspw. Lamp1) oder Autophagosomen (Bspw. Atg8a) eingesetzt werden. Eine noch genauere Lokalisation in der Ultrastruktur der Zellen könnte mit der Anfertigung von TEM-Bildern mit einem ImmunoGold Antikörper gegen GFP erreicht werden. Da diese Methode sehr aufwändig ist, und der Aufwand nicht im Verhältnis zum Informationsgewinn steht, wurde auf diese Methoden vorerst verzichtet.

Nachdem der funktionelle Knockout bzw. Knockdownnachweis erfolgt ist, und eine erste Charakterisierung der Auswirkungen desselben erfolgt ist, wurde nun eine Untersuchung der Fliegen im Hinblick auf ihre allgemeine Viabilität und speziell auf ihre Nephrozytenfunktion durchgeführt.

4. Die Überlebenskurve der Knockoutlinien

Mit einer Überlebenskurve der beiden Knockoutlinien im Vergleich zu der Wildtypkontrolle wurde die allgemeine Viabilität der Fliegenlinien analysiert.

Die CG5731-Knockoutlinie zeigte sowohl auf dem Kontrollmedium, als auch im Ansatz mit Silbernitrat eine höhere Mortalität als die Kontrolle. Obwohl diese Linie eine höhere α GAL-Aktivität besitzt als die CG7997-Knockoutlinie, scheint sie eine größere Einschränkung ihrer Lebensspanne zu erfahren. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist der genetische Hintergrund der Fliegen, der bei den kommerziell erworbenen Linien nicht der gleiche wie in der Kontrolle ist, der aber große Auswirkungen auf das Überleben haben kann. Abgesehen davon ist es möglich, dass CG5731 neben der Abspaltung von Galaktosylresten noch weitere, wichtige Aufgaben im Fliegenkörper übernimmt. Da es in der Literatur noch keine Informationen zu diesem Gen gibt, kann zu diesem Thema zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine weitere Aussage gemacht werden. Diese These würde jedoch auch erklären, warum es im Genom von *Drosophila melanogaster* zwei Enzyme mit einer scheinbar ähnlichen Funktion gibt.

Die CG7997-Knockoutlinie zeigte auf dem regulären Medium keine erhöhte Mortalität, die Fliegen scheinen die fehlende α GAL-Aktivität so gut zu kompensieren, dass sich diese nicht auf ihre Überlebenschancen auswirkt. Setzt man diese Fliegenlinie jedoch mit einem Toxinmedium mit 0,005% Silbernitrat unter Stress, so zeigt sich eine signifikant erniedrigte Viabilität im Vergleich zur Kontrolle. Da Silbernitrat von den Nephrozyten aus der Hämolymphe herausgefiltert und anschließend gespeichert wird, liefert dieses Versuchsergebnis erste Hinweise auf eine mögliche Schädigung der Nephrozyten durch die mangelnde α GAL-Aktivität. Offensichtlich können diese Schäden unter Optimalbedingungen jedoch minimiert werden und wirken sich nicht auf die allgemeine Viabilität aus.

5. Die Untersuchungen zur Nephrozytenfunktion

In welchem Ausmaß diese Schädigung der Nephrozyten auftritt, wurde unter anderem mit dem eleganten Versuchsprotokoll von Zhang et al.¹⁴⁶ untersucht.

Durch die Kombination einer Treiber- und Reporterlinie kann ein endogener Uptake Versuch mit den UAS-RNAi-Linien durchgeführt werden. Der Vergleich der beiden RNAi-Linien mit einer Positivkontrolle mit normalem Endozytoseverhalten ergab in dem untersuchten zweiten Larvenstadium keine Auffälligkeiten. In der kombinierten RNAi-Linie fiel eine starke Größendifferenz der Larven auf. Es war nicht möglich, 10 gleich große Larven für die Auswertung des Versuchs zu finden. Dieses Ergebnis verstärkt den Verdacht, dass diese Linie eventuell keinen einheitlichen Genotyp besitzt, sondern sich aus verschiedenen Genotypen zusammensetzt. Die kleinen Larven hatten außerdem einen signifikant erniedrigten Uptake, wobei die großen Larven sich nicht von der Positivkontrolle unterschieden. Die kleineren Larven scheinen also einen Genotyp zu haben, der sich massiv auf die Endozytosefunktion auswirkt. Ob es sich bei diesem Genotyp um den kombinierten Knockdown handelt, kann mit einer Genotypisierung der auffälligen Larven dieser Linie bestimmt werden.

Desweiteren sollten auch die Knockoutlinien auf ihre Endozytosefunktion untersucht werden. Dazu wurde ein Toxinassay mit Silbernitrat genutzt, welches von den Nephrozyten aus der Hämolymphe filtriert und endozytiert wird. Anschließend können die Garlandzellen des 3. Larvenstadiums seziiert und lichtmikroskopisch untersucht werden. In diesem Versuch fiel auf, dass sich CG5731-Knockout und Wildtypkontrolle in ihrer Endozytosefunktion nicht voneinander unterscheiden. Die CG7997-Knockoutlinie zeigte jedoch einen deutlichen Unterschied im Verteilungsmuster des Silbernitrats im Zytoplasma. Während das Silbernitrat in der Kontrolle gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt war, fiel in den CG7997-Knockout-Fliegen eine Akkumulation des Toxins in größeren Vesikeln auf. Offensichtlich haben diese Nephrozyten eine Störung des Endozytosewegs, und das endozytierte Silbernitrat kann nicht wie in der Kontrolle über das Zytoplasma der ganzen Zelle verteilt werden, um seine Toxizität zu verringern.

Normalerweise gelangen zu endozytierende Moleküle über die Nephrozytenmembran in die Lakunen, wo sie mittels rezeptorvermittelter Endozytose in Vesikel abgeschnürt und anschließend in primäre Endosomen aufgenommen werden⁴⁸. Diese reifen auf ihrem Weg durch das Zytoplasma der

Zelle zu sekundären Endosomen, und verschmelzen anschließend mit den Lysosomen zu Endolysosomen. Endolysosomen sind eine der Unterarten der sekundären Lysosomen, die als „Zebra bodies“ in TEM-Aufnahmen von Biopsien von Fabrypatienten zu sehen sind. Das Lysosom hat einen sauren pH und enthält Enzyme (u.a. α GAL¹⁰⁹) zur Degradation der Moleküle. Gibt es eine Störung in der Abfolge dieser Schritte, so akkumulieren die Vesikel im Zytoplasma, da sie nicht mehr weiterverarbeitet werden können⁴⁷. Unsere Versuchsergebnisse beweisen, dass eine solche Störung der Abfolge dieser Schritte bei einem Knockout von CG7997 vorliegt. Auch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine Akkumulation von nicht weiter definierten Vesikeln im Zytoplasma der Zellen, und einen deutlich verfrühten Zelltod. Wenn die Nephrozyten aufgenommene Giftstoffe nicht mehr durch Verteilung und Modifikation unschädlich machen können, werden sie verfrüht in die Apoptose getrieben.

6. Die Untersuchung der endosomalen Kompartimente

Um zu determinieren, wo genau diese Störung des Endozytoseprozesses liegt, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit den beiden Endozytosemarkern Rab5 und Rab7 durchgeführt, deren Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert werden sollen. In Zukunft können diese mit Silbernitrat behandelten Nephrozyten zusätzlich mittels Transmissionselektronenmikroskopie ausgewertet werden, um einen genaueren Eindruck über die Lokalisation der durch das enthaltende Silbernitrat elektronendicht erscheinenden Vesikel in der Zelle zu erhalten.

Die vorhergegangenen Versuchsergebnisse zur Nephrozytenfunktion beurteilten die Endozytosefunktion über einen längeren Zeitraum hinweg. Um einen Eindruck dieser Funktion in einem definierten Zeitraum zu erhalten, wurde ein gepulster, ex-vivo Uptakeversuch mit adulten, perikardialen Nephrozyten durchgeführt. Dadurch können Abbau- und Umbauprozesse innerhalb der Zelle, sowie Akkumulationseffekte, die das Ergebnis verfälschen können, ausgeschlossen werden.

Am 14. Lebenstag zeigten die Nephrozyten der beiden Fabry-Knockoutlinien keinen Unterschied in ihrer Endozytosefunktion im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Am 28. Lebenstag jedoch nahm die Endozytoserate der CG7997-Knockoutlinie drastisch ab. Die Nephrozyten dieser Linie scheinen also im Alter eine Einschränkung ihrer Filtrations- und Endozytosefähigkeit zu erfahren. Dieses Versuchsergebnis unterstreicht die zuvor postulierte Hypothese eines fehlregulierten Endozytosewegs.

Die Weiterverarbeitung der Vesikel innerhalb der Zelle ist schon im Larvenstadium gestört, die Vesikel akkumulieren und in der adulten Fliege zeigt sich dieser „Rückstau“ letztendlich in einer herabregulierten Aufnahmefähigkeit für exogen zugeführte Moleküle. Dieses Versuchsergebnis deckt sich außerdem mit den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nephrozyten gleichen Alters, in denen fast keine Nephrozytenmembranen mehr zu sehen waren. Auch diese nicht mehr intakte Zellbarriere trägt zu einer geringeren Aufnahmefähigkeit für Albumin bei.

Die vorherigen Versuchsergebnisse deuten stark auf eine Störung der endolysosomalen Kompartimente hin. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Garlandzellen des 3. Larvenstadiums mit den Endozytosemarkern Rab5 und Rab7 durchgeführt. Rab5 ist ein Marker für

frühe Endosomen und spielt eine wichtige Rolle bei deren homotypischer Fusion^{122,123}. Rab7 befindet sich unter anderem in der Membran von späten Endosomen¹²⁴ und hat verschiedene Aufgaben, es ist beispielsweise wichtig für die Reifung von frühen zu späten Endosomen und deren anschließendem Transport zu den Lysosomen^{125,126,127}.

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine deutliche Störung der endosomalen Kompartimente in den Nephrozyten der CG7997-Knockoutlinie. Die Kompartimente waren nicht mehr klar voneinander abgrenzbar und das Rab5 Signal lokalisierte nicht wie erwartet in der Peripherie der Zelle, sondern war deutlich stärker ausgeprägt und erstreckte sich bis fast an die Zellkerne heran. Das Rab7 Signal war schwächer ausgeprägt als in der Kontrolle und befand sich in der Mitte der Zelle um die Zellkerne herum. Die Akkumulation der Rab5-positiven Vesikel und die Abnahme der Anzahl an Rab7-positiven Vesikeln lokalisieren das Problem möglicherweise in der Reifung der frühen Endosomen zu späten Endosomen. Möglicherweise sind also die Vesikel, die in den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der adulten Nephrozyten des CG7997-Knockouts zu sehen sind, früh-endosomalen Ursprungs. Dieser Sachverhalt kann mit ImmunoGold Färbungen weiter untersucht werden. Auch die Akkumulation des Silbernitrats in Vesikeln oder Vakuolen in den Nephrozyten dieser Linie passt in dieses Bild. Wie jedoch der genaue Zusammenhang zwischen dem Knockout eines Enzyms mit α -Galaktosidaseaktivität mit einer Störung der Endosomenreifung zusammenhängt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Es ist allerdings in anderen lysosomalen Speicherkrankheiten, unter anderem für Morbus Niemann-Pick, bereits eine Störung des endosomalen Transportsystems beschrieben^{147,148,149,150}.

7. Die Untersuchung der Autophagozytosewege

Da Rab5 und Rab7 auch eine Rolle in der Autophagozytose von eukaryotischen Zellen spielen^{151,152,153,154}, und in M. Fabry bereits eine Dysregulation der Autophagozytose in Podozyten in vitro nachgewiesen wurde¹²⁸, sollte auch das Autophagozytoseverhalten der Nephrozyten der beiden *Drosophila* Fabrylinien untersucht werden. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Garlandzellen des dritten Larvenstadiums mit den beiden Markern Atg8a (entspricht LC3 im Säuger¹²⁹) und p62 durchgeführt. In dieser Färbung war jedoch kein Unterschied der beiden Knockoutlinien im Vergleich zu der Wildtypkontrolle zu erkennen. Für die ausgewerteten Bilder wurden allerdings pro Genotyp lediglich 6 Larven präpariert und gefärbt, daher ist eine Wiederholung dieses Versuchs anzuraten. Außerdem ist zusätzlich eine Auswertung der RNAi-Linien interessant, da diese in den transmissionselektronischen Aufnahmen einen „fabryspezifischeren“ Phänotyp zeigen und daher zusätzlich wertvolle Informationen liefern können. Außerdem ist eine Validierung der Bindungsspezifität der beiden Antikörper, beispielsweise durch die Färbung von Nephrozyten eines Atg8a/p62 Knockouts, ein sinnvoller Schritt um die Interpretation dieses Versuchs zu erleichtern.

Das charakteristischste Merkmal von Morbus Fabry in der Humanmedizin ist die Akkumulation des Sphingolipids Globotriaosylceramid (Gb3). Diese Akkumulation müsste, um die Übertragbarkeit des Fabry *Drosophilamodells* auf den Menschen zu überprüfen, auch in der Fliege nachweisbar sein. Globotriaosylceramid ist jedoch eine sehr variable Verbindung, die einzig durch ihren Zuckerrest (Gal-Gal-Glc), einen Ceramid- und einen Fettsäurerest definiert ist¹³³. Sowohl das Ceramid als auch die Fettsäure sind weder in ihrer Länge noch in ihrer Sättigung konstant. Dies erschwert den Nachweis dieser Stoffgruppe enorm, zumal zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Daten zu Gb3 in *Drosophila* publiziert sind.

8. Die Suche nach Globotriaosylceramid

Es waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur zwei Immunfluoreszenzantikörper gegen Gb3 auf dem Markt (anti-Gb3 Monoclonal Antibody von amsbio und anti-CD77/Gb3 monoclonal Antibody von abcam). Einer dieser Antikörper wurde in Immunfluoreszenzfärbungen an *Drosophila* Nephrozyten der RNAi-Linien getestet und führte leider zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Das Gb3-Signal war nur mit extrem hohen Lasereinstellungen sichtbar und begrenzte sich hauptsächlich auf ein unspezifisches Hintergrundrauschen. Der Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Gb3 (CD77/Gb3 monoclonal Antibody von abcam), daher besteht die Möglichkeit, dass er *Drosophila*-Gb3 nicht erkennt. Ob man mit dem zweiten erhältlichen Antikörper mehr Erfolg hat, gilt es noch zu testen.

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises von Globotriaosylceramid ist die histochemische Färbung von Nephrozyten mit fluoreszenzmarkierten Lektinen¹⁵⁵. In der Literatur wurde dazu hauptsächlich das an α -Galactosylreste bindende *Bandeiraea Simplicifolia* Lectin I verwendet^{104,156}, für diese Arbeit wurde sich allerdings für das spezifischer bindende Shiga-like toxin, Untereinheit B (StxB) entschieden. Dieses Lektin bindet an den Dreifachzuckerrest von Gb3¹⁵⁷ und bietet daher eine höhere Spezifität für den Nachweis von Gb3.

Es wurden histochemische Färbungen der perikardialen Nephrozyten der Knockout- und der RNAi-Linien am 14. und am 28. Lebenstag angefertigt. Obwohl das Signal in diesen Färbungen eindeutig in den Nephrozyten lokalisiert, ist zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Fabry-Fliegen und der Kontrolle zu erkennen. Die Bindung der Lektine erfolgt unabhängig von der restlichen Kettenlänge der Verbindung, daher ist dieses Ergebnis überraschend. Entweder existiert *Drosophila*-Gb3 nur in sehr geringen Mengen, die durch eine solche histochemische Färbung nicht sichtbar gemacht werden können, oder das Molekül ist von der Bindung der Lektine abgeschirmt. Eventuell ist es lohnend, das bereits publizierte *Bandeiraea Simplicifolia* Lectin I^{104,156} auch in den beiden *Drosophila*-Fabrylinien zu testen.

Desweiteren wurde eine Dünnschichtchromatographie von Lipidextrakten aus ganzen Fliegen der Knockoutlinien und der Wildtypkontrolle durchgeführt. Nach der chromatographischen Auftrennung der Lipide erfolgte zuerst eine Sichtbarmachung mit dem unspezifischen Detektor Anisaldehyd, und anschließend ein Overlayassay mit biotinyliertem StxB (bStxB). Obwohl die unspezifische Detektion bewies, dass die Extraktion von Lipiden und deren

Auftrennung mit dem verwendeten Protokoll funktionierten, konnte mittels spezifischem Nachweis mit bStxB kein Gb3 in den Fliegenlinien nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann nicht auf sterische Abschirmung des Fliegen-Gb3 zurückgeführt werden. Die Vermutung liegt daher näher, dass *Drosophila* Gb3 nur in so geringen Mengen existiert, dass es durch diese vergleichsweise wenig sensitiven Methoden nicht nachgewiesen werden kann. Selbst in der CG7997-Knockoutlinie war kein erhöhter Gb3-Gehalt nachzuweisen. Ob dies an dem Extraktionsprotokoll liegt, welches ursprünglich für Zellkultur entwickelt wurde¹³⁵ und an *Drosophila* angepasst wurde, oder daran, dass ein Knockout von CG7997 nicht zu einer Akkumulation von Gb3 führt, kann allein anhand dieser Experimente nicht bewiesen werden.

Eine sinnvolle weiterführende Untersuchung zu dieser Thematik ist die Analyse der Fliegenextrakte mittels LCMS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry). Auch hier muss zuerst ein Extraktionsprotokoll entwickelt werden, welches eine möglichst hohe Konzentration von Gb3 in den Proben gewährleistet. Anschließend kann mit den gängigen Methoden gezielt nach bekannten Gb3-Massen gesucht werden. Weichen allerdings die *Drosophila*-Gb3 Massen von diesen ab, wird die Suche deutlich erschwert. Trotzdem bietet diese Methode auf Grund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität die vielversprechendste Möglichkeit für den Nachweis von Globotriaosylceramid in *Drosophila*.

9. Die Untersuchungen zum Fliegentranskriptom

Um das Expressionslevel des Transkriptoms der CG7997-Knockoutlinie mit dem der Wildtypkontrolle zu vergleichen, wurde eine RNA Sequenzierung in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Nicola Wanner durchgeführt. Dabei sollten, abgesehen von der vergleichenden Auswertung des gesamten Transkriptoms, besonders diejenigen Stoffwechselwege untersucht werden, in denen α GAL eine Rolle spielt, sowie Stoffwechselwege, die in den durchgeführten Versuchen Auffälligkeiten zeigten.

Zunächst wurde die Expression der beiden Fabrygene CG5731 und CG7997 in beiden Knockoutlinien untersucht. Die CG5731-Knockoutlinie exprimiert wie erwartet kein CG5731. Die CG7997-Knockoutlinie hingegen exprimiert sowohl kein CG7997 als auch nur wenige Exons von CG5731. Dieses Phänomen lässt sich entweder auf eine tatsächliche Herabregulation von CG5731 zurückführen, oder aber auf off-target-Effekte des CG7997-Knockouts. Da dieser Versuch nur insgesamt einmal durchgeführt wurde, sollte er unbedingt in Zukunft wiederholt werden, eventuell auch mit einer anderen Kontrolllinie, die dem genetischen Hintergrund des CG7997-Knockouts besser entspricht.

Des weiteren wurden alle regulierten Stoffwechselwege, anhand ihrer biologischen Funktion (Gene Ontology - Terms) zusammengefasst, vergleichend ausgewertet. Leider waren diese Stoffwechselwege sehr unspezifisch, und Gene, die für Endozytose wichtig sind, waren nicht signifikant reguliert. Allgemein war der Zellzyklus hochreguliert, und Signalwege für Muskelaufbau und verschiedene Stoffwechselwege herabreguliert. Im Stoffwechselweg von Gb3 (Sphingolipidstoffwechsel – Globoserie, KEGG Signalweg #00063) fällt auf, dass die beiden Enzyme β -N-Acetylhexosaminidase (3.2.1.52) und α -N-Acetylgalactosaminidase (3.2.1.49, α NAGAL, wird bei Keggpathway mit CG5731 angegeben) in der CG7997-Knockoutlinie herabreguliert sind. Beide Enzyme katalysieren in Richtung Gb3-Synthese, durch deren Herabregulation wird also insgesamt weniger Gb3 produziert. Ob dieser Kompensationsmechanismus jedoch ausreicht, um die fehlende Nachweisbarkeit von Gb3 in *Drosophila* zu erklären, bleibt fraglich. Die Sequenzhomologe des restlichen Signalwegs sind nicht bekannt und können daher auch nicht ausgewertet werden.

V. RETROSPEKTIVE VERBESSERUNGSMÖGLICHKEITEN DER ARBEIT

Obwohl die Versuchsergebnisse faszinierende neue Einblicke in die Pathogenese von Morbus Fabry bieten, und die hohe evolutionäre Konserviertheit der von M. Fabry betroffenen Stoffwechselwege und die Auswirkungen einer Störung derselben gezeigt werden konnte, ist keine Arbeit perfekt. Um einen größtmöglichen Lernnutzen aus eventuell gemachten Fehlern zu ziehen, soll nun retrospektiv der Frage nach möglichen Schwachstellen der erstellten Arbeit nachgegangen werden. Was hätte man im Nachhinein betrachtet anders oder sogar besser machen können?

Die erste Frage, die zu erörtern ist, befasst sich mit der frühzeitigen „Spezialisierung“ des Modells auf die nephrologische Forschung. Eventuell wäre auch eine breitere Aufstellung des Modells interessant gewesen. Da allerdings das Labor, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, ein hochspezialisiertes *Drosophila*-Nephrozytenlabor ist und alle Methoden diesbezüglich ausgezeichnet etabliert sind, wurde sich für diese frühe Spezialisierung entschieden.

Ein weiterer möglicher Kritikpunkt ist das Fehlen eines Knockout- bzw. Knockdownnachweises auf DNA-Ebene. Im Nachhinein betrachtet hätte dieser Schritt einige Zweifel zu schwankenden oder nicht zusammenpassenden Versuchsergebnissen ausräumen und erklären können.

Außerdem hätte nach der erfolgten Genotypisierung und dem funktionellen Knockoutnachweis durch den Enzymaktivitätstest zusätzlich zur Erstellung der kombinierten RNAi-Linie auch eine kombinierte Knockoutlinie zusammengekreuzt werden können. Zu diesem Zeitpunkt schien die Doppel-RNAi-Linie allerdings als ausreichend, erst später wurde klar, dass diese Linie keinen konstant reproduzierbaren Phänotyp zeigt und ein Doppelknockout von großem Nutzen gewesen wäre.

Abschließend lässt sich sagen, dass solche kleinen Schwachstellen im Nachhinein betrachtet leicht zu identifizieren scheinen, im tatsächlichen Ablauf der Arbeit jedoch ist dies oft nicht ganz so eindeutig. Alle Entscheidungen wurden nach bestem Wissen und Gewissen getroffen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde ein neues Tiermodell mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* für die lysosomale Speicherkrankheit Morbus Fabry etabliert, charakterisiert und zur Erstellung neuer Theorien hinsichtlich der Pathogenese dieser Krankheit genutzt. Dieses Modell kann universell eingesetzt werden, wurde jedoch besonders im Hinblick auf nephrologische Fragestellungen entwickelt.

Zu Beginn wurden die beiden Gene CG5731 und CG7997 als Homologe des in M. Fabry mutierten Gens GLA in *Drosophila* identifiziert und anschließend per Transposoninsertion erstellte Knockoutlinien und UAS-RNAi-Linien von den einschlägigen Vertreibern bezogen. Es wurde ein funktioneller Knockout- bzw. Knockdownnachweis mittels Enzymaktivitätstest durchgeführt und die getesteten Linien anschließend mit verschiedenen Mitteln wie Mikroskopieverfahren, Immunfluoreszenzfärbungen, Methoden zur Untersuchung der Filtrations- und Endozytosefähigkeit der Nephrozyten, Dünnschichtchromatographie sowie Transkriptom-sequenzierungsmethoden charakterisiert.

Der Knockout bzw. Knockdown des Gens CG7997 zeigte dabei durchgehend den stärksten Phänotyp, die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nephrozyten des CG7997-Knockdowns zeigten sogar den aus dem Säuger bekannten, für M. Fabry typischen Phänotyp mit elektronendichten, lamellären Einschlusskörperchen. Auch eine Funktionseinschränkung der Nephrozyten konnte nachgewiesen werden, was den Nutzen des Modells für die Forschung an der Fabry Nephropathie unterstreicht.

Zusätzlich zur Etablierung und Charakterisierung dieses neuen Modells konnte in den verschiedenen Versuchen eine Störung des vesikelgebundenen Endozytosewegs in Nephrozyten des CG7997-Knockouts gezeigt werden und damit ein neuer Ansatz zur Klärung der Pathogenese von Morbus Fabry geschaffen werden. In anderen lysosomalen Speicherkrankheiten wurde ein ähnliches Phänomen bereits beschrieben, für M. Fabry ist dieser Ansatz jedoch komplett neu.

Somit wurde die Zielsetzung dieser Arbeit sogar übertroffen und in Zukunft können weitere Theorien und Therapieansätze an diesem Modell getestet und entwickelt werden.

VII. SUMMARY

In this work, a new animal model for the lysosomal storage disorder Fabry disease with the model organism *Drosophila melanogaster* was generated, characterised and established. It was furthermore used to develop new theories concerning the pathogenesis of this rare but fatal disease. This new model can be used universally, but was especially designed for the nephrologic aspects of Fabry disease.

The two *Drosophila* genes CG5731 and CG7997 were identified to be the homologues of the gene GLA, which is mutated in patients with Fabry disease. Knockout-flylines, that had been generated by transposoninsertion, as well as RNAi-knockdownlines of both genes were ordered and their functionality tested with an established α GLA enzyme activity assay. Consequently, the lines were further evaluated with different techniques such as light- and immunofluorescence microscopy, electron microscopy, different methods to evaluate the endocytotic function of nephrocytes and RNAseq analysis.

The CG7997 knockout and knockdownlines showed the most significant phenotype in nearly all of the experiments performed. The transmissionelectron microscopy images of nephrocytes of the CG7997 knockoutline even showed the characteristic phenotype known from patient kidney biopsies, with the electrondense enlarged secondary lysosomes (zebrabodies). The nephrocytes of this line also showed deficits in their endocytotic function, which underlines the advantages of this model for all nephrocytic purposes.

In addition to the characterisation of the two *Drosophila* genes, a disruption of the vesicle bound endocytotic pathway in nephrocytes of the CG7997 knockout could be shown. This evidence leads to new theories of the pathogenesis of Fabry disease. In other lysosomal storage diseases a similar phenomenon has been described, which further underlines the relevance of these findings.

The aim of this work, to generate a new animal model for Fabry disease, was excelled with the results of the realised experiments. In the future, new theories and therapies can be developed and tested with the help of this new animal model.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Morgan, T. H. SEX LIMITED INHERITANCE IN DROSOPHILA. *Science* **32**, 120–2 (1910).
2. Al-Anzi, B. *et al.* Obesity-Blocking Neurons in Drosophila. *Neuron* **63**, 329–341 (2009).
3. Kawasaki, K. *et al.* Use of Drosophila as an evaluation method reveals imp as a candidate gene for type 2 diabetes in rat locus Niddm22. *J. Diabetes Res.* **2015**, 758564 (2015).
4. Adams, M. D. *et al.* The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science* **287**, 2185–95 (2000).
5. Rubin, G. M. *et al.* Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204–15 (2000).
6. Hanks, M. C. *et al.* Drosophila engrailed can substitute for mouse Engrailed1 function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* **125**, (1998).
7. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–15 (1993).
8. Cooley, L., Kelley, R. & Spradling, A. Insertional mutagenesis of the Drosophila genome with single P elements. *Science* **239**, 1121–8 (1988).
9. Daniels, S. B. & Chovnick, A. P element transposition in Drosophila melanogaster: an analysis of sister-chromatid pairs and the formation of intragenic secondary insertions during meiosis. *Genetics* **133**, 623–36 (1993).
10. Attrill, H. *et al.* FlyBase: establishing a Gene Group resource for Drosophila melanogaster. *Nucleic Acids Res.* **44**, D786-92 (2016).
11. JT, P. Studies in the Genetics of Drosophila. III. the Drosophilidae of the Southwest. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **36**, (1943).

12. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–11 (1998).
13. Yamamoto-Hino, M. & Goto, S. In Vivo RNAi-Based Screens: Studies in Model Organisms. *Genes (Basel)*. **4**, 646–665 (2013).
14. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* **101**, 25–33 (2000).
15. Hannon, G. J., Hammond, S. M., Bernstein, E. & Beach, D. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–296 (2000).
16. Na, J. & Cagan, R. The *Drosophila* nephrocyte: back on stage. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 161–3 (2013).
17. Kowalevsky A. Ein Beitrag zur Kenntnis der Exkretionsorgane. *Biol Zent Bl Leipzig* **9** (1889).
18. Bruntz L. Contribution à l'étude de l'excrétion chez les Arthropodes. *Arch Biol* **20** 217–222 (1903).
19. Denholm, B. & Skaer, H. Bringing together components of the fly renal system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 526–532 (2009).
20. Weavers, H. *et al.* The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature* **457**, 322–6 (2009).
21. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. 1956-, Voll, M. & Georg Thieme Verlag KG. *Prometheus - LernAtlas der Anatomie: Innere Organe*. (Thieme, 2015).
22. Boron, W. F. & Boulpaep, E. L. *Medical physiology*.
23. Tisher, C. C. Functional anatomy of the kidney. *Hosp. Pract.* **13**, UNKNOWN (1978).
24. Lote, C. J. *Principles of renal physiology*. (Kluwer Academic Publishers, 2000).

25. Tryggvason, K. & Wartiovaara, J. How does the kidney filter plasma? *Physiology (Bethesda)*. **20**, 96–101 (2005).
26. Bohrer, M. P. *et al.* Permselectivity of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations. *J. Clin. Invest.* **61**, 72–8 (1978).
27. Avasthi, P. S. & Koshy, V. The anionic matrix at the rat glomerular endothelial surface. *Anat. Rec.* **220**, 258–66 (1988).
28. Brenner, B. M., Hostetter, T. H. & Humes, H. D. Molecular Basis of Proteinuria of Glomerular Origin. *N. Engl. J. Med.* **298**, 826–833 (1978).
29. Chen, Y. M. & Miner, J. H. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. *Transl. Res.* **160**, 291–7 (2012).
30. Peter D. Yurchenco & Jules O'Rear. *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes: Cell Biology - David H Rohrbach - Google Books*. (Rohrbach D H, Timpl R (Academy, New York), 1993).
31. Furukawa, T. *et al.* Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution. *Kidney Int.* **40**, 621–624 (1991).
32. Caulfieldt, J. P. & Farquhar, M. G. THE PERMEABILITY OF GLOMERULAR CAPILLARIES OF AMINONUCLEOSIDE NEPHROTIC RATS TO GRADED DEXTRANS* 62 PERMEABILITY OF NEPHROTIC GLOMERULAR CAPILLARIES. *J. Exp. Med.* **142**, (1975).
33. Rodewald, R. & Karnovsky, M. J. POROUS SUBSTRUCTURE OF THE GLOMERULAR SLIT DIAPHRAGM IN THE RAT AND MOUSE. *J. Cell Biol.* **60**, (1974).
34. Kestilä, M. *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* **1**, 575–82 (1998).
35. Lenkkeri, U. *et al.* Structure of the Gene for Congenital Nephrotic Syndrome of the Finnish Type (NPHS1) and Characterization of Mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 51–61 (1999).

36. Tryggvason, K. Unraveling the Mechanisms of Glomerular Ultrafiltration Nephlin, a Key Component of the Slit Diaphragm. *J. Am. Soc. Nephrol.* (1999).
37. Schwarz, K. *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* **108**, 385–397 (2001).
38. Schnabel, E., Anderson, J. M. & Farquhar, M. G. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J. Cell Biol.* **111**, (1990).
39. Li, C., Ruotsalainen, V., Tryggvason, K., Shaw, A. S. & Miner, J. H. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **279**, (2000).
40. Shih, N.-Y. *et al.* Congenital Nephrotic Syndrome in Mice Lacking CD2-Associated Protein. *Science* (80-.). **286**, (1999).
41. Inoue, T. *et al.* FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int.* **59**, 1003–1012 (2001).
42. Donoviel, D. B. *et al.* Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4829–36 (2001).
43. Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M. & Mundel, P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1–8 (2000).
44. Hollande, A. La cellule pericardiale des insectes. *Arch. d'Anat. Microsc. Paris* **18**, 85-307 (1921).
45. Mills, R. P. & King, R. C. The pericardial cells of *Drosophila melanogaster*. *Q. J. Microsc. Sci.* **106**, 261–8 (1965).
46. Locke M & Russel V. *Pericardial cells or athrocyte. Microscopic Anatomy of Invertebrates. Insecta.* **11B**, (Wiley, 1998).
47. Kosaka, T. & Ikeda, K. Reversible Blockage of Membrane Retrieval and Endocytosis in the Garland Cell of the Temperature-sensitive Mutant of *Drosophila melanogaster* , shibire *tsl*. 499–507 (1983).

48. Wigglesworth, V. B. (Vincent B. *The principles of insect physiology*,. (Chapman and Hall, 1972).
49. Barletta, G.-M., Kovari, I. A., Verma, R. K., Kerjaschki, D. & Holzman, L. B. Nephric and Neph1 Co-localize at the Podocyte Foot Process Intercellular Junction and Form cis Hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.* **278**, 19266–19271 (2003).
50. Zhuang, S. *et al.* Sns and Kirre, the Drosophila orthologs of Nephric and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. *Development* **136**, 2335–2344 (2009).
51. Simons, M. & Huber, T. B. Flying podocytes. *Kidney Int.* **75**, 455–457 (2009).
52. Gal, A. E. & Bradley, R. O. Y. M. The metabolism of ceramide trihexoside. (1967).
53. Desnick RJ, Ioannou YA, E. C. α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. p 3733-74 (2001).
54. ANDERSON, W. A CASE OF 'ANGEIO-KERATOMA.' *Br. J. Dermatol.* **10**, 113–117 (1898).
55. Fabry, J. Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Arch. Dermatol. Syph.* **43**, 187–200 (1898).
56. Rutter M, P. A. W. M. Angiokeratoma corporis diffusum (universal) mit kardiodvasorenalem Symptomenkomplex bei 3 Brüdern. *Dermal U Syph* 179 165. **179: 165**, (1993).
57. Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E. & Carey, W. F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**, 249–54 (1999).
58. Fuller, M., Meikle, P. J. & Hopwood, J. J. *Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* (Oxford PharmaGenesis, 2006).
59. Spada, M. *et al.* High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 31–40 (2006).

60. Lin, H.-Y. *et al.* High Incidence of the Cardiac Variant of Fabry Disease Revealed by Newborn Screening in the Taiwan Chinese Population. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2**, 450–456 (2009).
61. Haskins, M. E., Jezyk, P. F., Desnick, R. J. & Patterson, D. F. Animal model of human disease: Mucopolysaccharidosis VI Maroteaux-Lamy syndrome, Arylsulfatase B-deficient mucopolysaccharidosis in the Siamese cat. *Am. J. Pathol.* **105**, 191–3 (1981).
62. Sandstrom, B., Westman, J. & Ockermann, P. A. Glycogenosis of the central nervous system in the cat. *Acta Neuropathol.* **14**, 194–200 (1969).
63. Walvoort, H. C. Glycogen storage disease type II in the Lapland dog. *Vet. Q.* **7**, 187–190 (1985).
64. Haskins, M. E., Jezyk, P. F., Desnick, R. J., McDonough, S. K. & Patterson, D. F. Alpha-L-iduronidase Deficiency in a Cat: A Model of Mucopolysaccharidosis I. *Pediatr. Res* **13**, 1294–1297 (1979).
65. Wilkerson, M. J., Lewis, D. C., Marks, S. L. & Prieur, D. J. Clinical and morphologic features of mucopolysaccharidosis type II in a dog: naturally occurring model of Hunter syndrome. *Vet. Pathol.* **35**, 230–3 (1998).
66. Fischer, A. *et al.* Sulfamidase Deficiency in a Family of Dachshunds: A Canine Model of Mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo A). *Pediatr. Res.* **44**, 74–82 (1998).
67. Haskins, M. E. *et al.* Mucopolysaccharidosis type VII (Sly syndrome). Beta-glucuronidase-deficient mucopolysaccharidosis in the dog. *Am. J. Pathol.* **138**, 1553–5 (1991).
68. Skelly, B. J. & Franklin, R. J. M. Recognition and Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases in the Cat and Dog. *J. Vet. Intern. Med.* **16**, 133–141 (2002).
69. SWEELEY, C. C. & KLIONSKY, B. FABRY'S DISEASE: CLASSIFICATION AS A SPHINGOLIPIDOSIS AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL GLYCOLIPID. *J. Biol. Chem.* **238**, 3148–50 (1963).
70. Eng, C. M. *et al.* Fabry disease: Baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 184–192 (2007).

71. Das, A. M. & Naim, H. Y. Biochemical basis of Fabry disease with emphasis on mitochondrial function and protein trafficking. *Adv. Clin. Chem.* **49**, 57–71 (2009).
72. Lücke, T., Höppner, W., Schmidt, E., Illsinger, S. & Das, A. M. *Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. Molecular Genetics and Metabolism* **82**, (2004).
73. Strasberg, P. M. & Callahan, J. W. Lysosphingolipids and mitochondrial function. II. Deleterious effects of sphingosylphosphorylcholine. *Biochem. Cell Biol.* **66**, 1322–1332 (1988).
74. Palecek, T. *et al.* Association between cardiac energy metabolism and gain of left ventricular mass in Fabry disease. *International Journal of Cardiology* **144**, (2010).
75. Ries, M. *et al.* Pediatric Fabry Disease. *Pediatrics* **115**, (2005).
76. Peters, F. P., Sommer, A., Vermeulen, A., Cheriex, E. C. & Kho, T. L. Fabry's disease: a multidisciplinary disorder. *Postgrad. Med. J.* **73**, 710–2 (1997).
77. Linhart, A. *et al.* Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease: results from the international Fabry outcome survey. *Eur. Heart J.* **28**, 1228–1235 (2007).
78. Schiffmann, R. *et al.* Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 2102–2111 (2009).
79. Fellgiebel, A., Müller, M. J. & Ginsberg, L. CNS manifestations of Fabry's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 791–795 (2006).
80. Nakao, S. *et al.* An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* **333**, 288–93 (1995).
81. Scheidt, W. von *et al.* An Atypical Variant of Fabry's Disease with Manifestations Confined to the Myocardium. *N. Engl. J. Med.* **324**, 395–399 (1991).

82. Nakao, S. *et al.* Fabry disease: Detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a 'renal variant' phenotype1. *Kidney Int.* **64**, 801–807 (2003).
83. Nakao, S. *et al.* Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a 'renal variant' phenotype. *Kidney Int.* **64**, 801–7 (2003).
84. Wang, R. Y., Lelis, A., Mirocha, J. & Wilcox, W. R. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet. Med.* **9**, 34–45 (2007).
85. Wilcox, W. R. *et al.* Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: Lessons from the Fabry Registry. *Mol. Genet. Metab.* **93**, 112–128 (2008).
86. Romeo, G. & Migeon, B. R. Genetic inactivation of the alpha-galactosidase locus in carriers of Fabry's disease. *Science* **170**, 180–1 (1970).
87. LYON, M. F. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372–373 (1961).
88. Ellaway, C. Paediatric Fabry disease. *Transl. Pediatr.* **5**, 37–42 (2016).
89. Linthorst, G. E., Poorthuis, B. J. H. M. & Hollak, C. E. M. Enzyme Activity for Determination of Presence of Fabry Disease in Women Results in 40% False-Negative Results. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 2082 (2008).
90. Echevarria, L. *et al.* X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin. Genet.* **89**, 44–54 (2016).
91. Mapes, C. A., Anderson, R. L., Sweeley, C. C., Desnick, R. J. & Krivit, W. Enzyme replacement in Fabry's disease, an inborn error of metabolism. *Science* **169**, 987–9 (1970).
92. Brady, R. O. *et al.* Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *N. Engl. J. Med.* **289**, 9–14 (1973).
93. Eng, C. M. *et al.* A Phase 1/2 Clinical Trial of Enzyme Replacement in Fabry Disease: Pharmacokinetic, Substrate Clearance, and Safety Studies. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 711–722 (2001).

-
94. Eng, C. M. *et al.* Safety and Efficacy of Recombinant Human α -Galactosidase A Replacement Therapy in Fabry's Disease. *N. Engl. J. Med.* **345**, 9–16 (2001).
 95. Thurberg, B. L. *et al.* Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int.* **62**, 1933–1946 (2002).
 96. El Dib, R. P. & Pastores, G. M. Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease. *Cochrane database Syst. Rev.* CD006663 (2010). doi:10.1002/14651858.CD006663.pub2
 97. Germain, D. P. *et al.* Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N. Engl. J. Med.* **375**, 545–555 (2016).
 98. Hughes, D. A. *et al.* Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J. Med. Genet.* jmedgenet-2016-104178 (2016). doi:10.1136/jmedgenet-2016-104178
 99. Wu, X. *et al.* A pharmacogenetic approach to identify mutant forms of α -galactosidase a that respond to a pharmacological chaperone for Fabry disease. *Hum. Mutat.* **32**, 965–977 (2011).
 100. Donati, D., Novario, R. & Gastaldi, L. Natural history and treatment of uremia secondary to Fabry's disease: an European experience. *Nephron* **46**, 353–9 (1987).
 101. K Scriba. Zur Pathogenese des Angiokeratoma corporis diffusum Fabry mit cardio-vaso-renalem Symptomenkomplex. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **34**, 221, 1951 doi:10.1016/0002-9343(61)90037-7
 102. Germain, D. P. Fabry disease. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 30 (2010).
 103. Faraggiana, T. *et al.* Light- and electron-microscopic histochemistry of Fabry's disease. *Am. J. Pathol.* **103**, 247–62 (1981).
 104. Ohshima, T. *et al.* alpha-Galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2540–4 (1997).
 105. Taguchi, A. *et al.* A symptomatic Fabry disease mouse model generated by inducing globotriaosylceramide synthesis. *Biochem. J.* **456**, 373–83 (2013).

106. Hujová, J. *et al.* Characterization of gana-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a single ortholog of vertebrate alpha-galactosidase and alpha-N-acetylgalactosaminidase. *BMC Cell Biol.* **6**, 5 (2005).
107. Shankland, S. J., Pippin, J. W., Reiser, J. & Mundel, P. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int.* **72**, 26–36 (2007).
108. Lőrincz, P. *et al.* MiniCORVET is a Vps8-containing early endosomal tether in *Drosophila*. *Elife* **5**, (2016).
109. Mayes, J. S., Scheerer, J. B., Sifers, R. N. & Donaldson, M. L. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin. Chim. Acta* **112**, 247–251 (1981).
110. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105–1111 (2009).
111. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106 (2010).
112. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
113. Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**, D387-92 (2009).
114. Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* **30 Suppl 1**, S162-73 (2009).
115. Biasini, M. *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**, W252-8 (2014).
116. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201 (2006).
117. Garman, S. C. & Garboczi, D. N. The molecular defect leading to fabry disease: Structure of human α -galactosidase. *J. Mol. Biol.* **337**, 319–335 (2004).

118. Wang, A. M., Bishop, D. F. & Desnick, R. J. Human alpha-N-acetylgalactosaminidase-molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA. Homology with human alpha-galactosidase A suggests evolution from a common ancestral gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 21859–66 (1990).
119. Clark, N. E. & Garman, S. C. The 1.9 Å structure of human alpha-N-acetylgalactosaminidase: The molecular basis of Schindler and Kanzaki diseases. *J. Mol. Biol.* **393**, 435–47 (2009).
120. Desnick, R. J. *et al.* Fabry's disease: Enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. *J. Lab. Clin. Med.* **81**, 157–171 (1973).
121. Kusiak, J. W., Quirk, J. M. & Brady, R. Purification and Properties of the Two Major α + Galactosidase from Human Placenta * Isozymes. **253**, 184–190 (1977).
122. Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. & Gruenberg, J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915–25 (1991).
123. Bucci, C. *et al.* The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715–28 (1992).
124. Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. & Zerial, M. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317–329 (1990).
125. Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. & van Deurs, B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* **11**, 467–80 (2000).
126. Vanlandingham, P. A. & Ceresa, B. P. Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J. Biol. Chem.* **284**, 12110–24 (2009).
127. Vanlandingham, P. A. & Ceresa, B. P. Rab7 Regulates Late Endocytic Trafficking Downstream of Multivesicular Body Biogenesis and Cargo Sequestration. *J. Biol. Chem.* **284**, 12110–12124 (2009).
128. Liebau, M. C. *et al.* Dysregulated Autophagy Contributes to Podocyte Damage in Fabry's Disease. *PLoS One* **8**, (2013).

129. Scott, R. C. *et al.* Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell* **7**, 167–78 (2004).
130. Scott, R. C., Juhász, G. & Neufeld, T. P. Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death. *Curr. Biol.* **17**, 1–11 (2007).
131. Kim, J. Y. *et al.* Serum globotriaosylceramide assay as a screening test for Fabry disease in patients with ESRD on maintenance dialysis in Korea. *Korean J. Intern. Med.* **25**, 415–421 (2010).
132. Valbuena, C., Leitão, D., Carneiro, F. & Oliveira, J. P. Immunohistochemical diagnosis of Fabry nephropathy and localisation of globotriaosylceramide deposits in paraffin-embedded kidney tissue sections. *Virchows Arch.* **460**, 211–221 (2012).
133. Falk, K.-E., Karlsson, K.-A. & Samuelsson, B. E. Proton nuclear magnetic resonance analysis of anomeric structure of glycosphingolipids: The globo-series (one to five sugars). *Arch. Biochem. Biophys.* **192**, 164–176 (1979).
134. Kushi, Y., Rokukawa, C. & Handa, S. Direct analysis of glycolipids on thin-layer plates by matrix-assisted secondary ion mass spectrometry: application for glycolipid storage disorders. *Anal. Biochem.* **175**, 167–76 (1988).
135. BLIGH, E. G. & DVER, W. J. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. **37**, (1959).
136. Wilhelm, B. T. *et al.* Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* **453**, 1239–43 (2008).
137. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–8 (2008).
138. Celniker, S. E. *et al.* Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0079 (2002).
139. Luo, W. & Brouwer, C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* **29**, 1830–1 (2013).

140. Van Diggelen, O. P. *et al.* LYSOSOMAL α -N-ACETYL GALACTOSAMINIDASE DEFICIENCY: A NEW INHERITED METABOLIC DISEASE. *The Lancet* **330**, 804 (1987).
141. van Diggelen, O. P. *et al.* α -N-acetylgalactosaminidase deficiency, a new lysosomal storage disorder. *J. Inherit. Metab. Dis.* **11**, 349–357 (1988).
142. Schindler, D. *et al.* Neuroaxonal Dystrophy Due to Lysosomal α -N-Acetylgalactosaminidase Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1735–1740 (1989).
143. Miller, D. E. *et al.* Whole-Genome Analysis of Individual Meiotic Events in *Drosophila melanogaster* Reveals That Noncrossover Gene Conversions Are Insensitive to Interference and the Centromere Effect. *Genetics* **203**, 159–171 (2016).
144. Nagata, M., Yamaguchi, Y. & Ito, K. Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys. *Anat. Embryol. (Berl)*. **187**, 275–279 (1993).
145. Alroy, J., Sabnis, S. & Kopp, J. B. Renal pathology in Fabry disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13 Suppl 2**, S134–8 (2002).
146. Zhang, F., Zhao, Y. & Han, Z. An in vivo functional analysis system for renal gene discovery in *Drosophila* pericardial nephrocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 191–7 (2013).
147. Pagano, R. E. *et al.* Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell Biol.* **1**, 386–388 (1999).
148. Choudhury, A. *et al.* Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J. Clin. Invest.* **109**, 1541–1550 (2002).
149. Pagano, R. E., Puri, V., Dominguez, M. & Marks, D. L. Membrane Traffic in Sphingolipid Storage Diseases. *Traffic* **1**, 807–815 (2000).
150. Chen, C.-S., Patterson, M. C., O'Brien, J. F., Pagano, R. E. & Wheatley, C. L. Broad screening test for sphingolipid-storage diseases. *Lancet* **354**, 901–905 (1999).

151. Li, L. *et al.* Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. *J. Biol. Chem.* **285**, 19705–19709 (2010).
152. Ravikumar, B., Imarisio, S., Sarkar, S., O’Kane, C. J. & Rubinsztein, D. C. Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. *J. Cell Sci.* **121**, 1649–60 (2008).
153. Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W. & Colombo, M. I. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **117**, 2687–2697 (2004).
154. Jager, S. *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* **117**, 4837–4848 (2004).
155. ROBINSON, D. & KHALFAN, H. A. Fabry’s disease. Identification of carrier status by fluorescent lectin binding. *Biochem. Soc. Trans.* **12**, (1984).
156. Kanda, A., Nakao, S., Tsuyama, S., Murata, F. & Kanzaki, T. Fabry disease: ultrastructural lectin histochemical analyses of lysosomal deposits. *Virchows Arch.* **436**, 36–42 (2000).
157. Ling, H. *et al.* Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry* **37**, 1777–1788 (1998).

IX. ANHANG

1. Abkürzungsverzeichnis

→	„treibt“, für Kreuzungen des UAS/Gal4 Systems
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
BDSC	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
BM	Basalmembran
bStxB	Biotinyliertes Shiga-like Toxin, Subunit B
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD77	Globotriaosylceramid als Rezeptor
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNS)
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CyO	Curly of Oyster
Dmel	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
Dot	Enhancer für perikardiale Nephrozyten
dsRNA	Double Stranded Ribonucleic Acid
EC	Enzyme Commission Number
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FP	Foot Process (Fußfortsatz der Podozyten)
g	Gramm
Gal	Galaktose

Gal4	Transkriptionsfaktor aus der Hefe
GalNac	N-Acetyl-D-Galaktosamin
Gb3	Globotriaosylceramid
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GCN	Garlandzellen
GFP	Green Fluorescent Protein
GLA	Gen, welches für α GAL kodiert
Glc	Glukose
GLP	Good Laboratory Practice
GSL	Glykosphingolipide
h	Stunde
HCOP	HGNC Comparison of Orthology Predictions
HEK	human embryonic kidney cells, menschliche embryonale Nierenzellen
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HSA	<i>Homo sapiens</i>
HUGO	Human Genome Organisation
ID	Identifikator
ITR	Inverted Terminal Repeat Sequence
Kirre	Kind of Irre
l	Liter
L3 / L2 / L1	Larven im 3. bzw. 2. bzw. 1. Larvenstadium
LCMS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie)
mg	Milligramm

mg	Milligramm
MHC-ANF-RFP	Myosin Heavy Chain – Atrium Natriuretic Factor – Red Fluorescent Protein
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Nephrocyte Diaphragm (Nephrozytenmembran)
nm	Nanometer
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PN	Perikardiale Nephrozyten
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
RNAseq	Gesamt Genom Shotgun Sequenzierung
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Slit Diaphragm (Schlitzmembran)
SEM	Scanning Electron Microscopy (Raster-elektronenmikroskopie)
Ser	Serrate
siRNA	small interfering RNA
SnS	Sticks and Stones

StxB	Shiga-like Toxin, Subunit B
StxB-Cy5	Cyanin5 markiertes Shiga-like Toxin, Untereinheit B
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
UAS	Upstream Activating Sequence
VDRC	Vienna <i>Drosophila</i> Research Center
WTB	Wildtyp Berlin
α GAL	α -Galaktosidase A
α NAGAL	α -N-Acetylgalaktosaminidase

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Geräte für die Fliegenarbeit und Laborgeräte allgemein.</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 2 Präparierwerkzeug und Mikroskope, ZBSA.</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 3 Geräte für Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie.</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 4 Geräte für Lektinfärbung und DC, BIOSS.</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien.</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 6 Chemikalien</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 7 Primärantikörper.</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 8 Sekundärantikörper.</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 9 Fluoreszenzmarkierte Lektine.</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 10 Medien und Lösungen</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 11 Gal4-Treiberstämme.</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 12 UAS-RNAi-Linien.</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 13 Knockoutlinien.</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 14 Andere Fliegenlinien.</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 15 Software.</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 16 Online Tools</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 17 Firmen.</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 18 TEM Einbettungsprotokoll</i>	<i>53</i>

3. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Transposoninsertion mit dem piggyBac Mechanismus.</i>	9
<i>Abbildung 2 Schema des Gal4/UAS-Systems bei Drosophila.</i>	11
<i>Abbildung 3 Schema der Funktionsweise der RNA Interferenz in Drosophila in Verbindung mit dem Gal4/UAS-System.</i>	12
<i>Abbildung 4 Schematischer Aufbau des renalen Filtrationssystems des Menschen.</i>	15
<i>Abbildung 5 Schema des renalen Systems von Drosophila melanogaster.</i>	17
<i>Abbildung 6 Exkretorisches System von Säuger (A und A') und Fliege (B und B').</i>	18
<i>Abbildung 7 Symptome von Morbus Fabry, nach Altersgruppe geordnet aufgelistet.</i>	22
<i>Abbildung 8 Histologische Veränderungen der Niere bei Fabry Nephropathie.</i>	25
<i>Abbildung 9 Präparierbank für Garlandzellen der Larve 3.</i>	42
<i>Abbildung 10 Präpariervorgang Garlandzellen, erster Teil.</i>	43
<i>Abbildung 11 Präpariervorgang Garlandzellen, zweiter Teil.</i>	44
<i>Abbildung 12 Fertiges Garlandzell-Präparat.</i>	45
<i>Abbildung 13 Präparierbank für perikardiale Nephrozyten der adulten Fliege.</i>	46
<i>Abbildung 14 Präpariervorgang perikardiale Nephrozyten, erster Teil.</i>	47
<i>Abbildung 15 Präpariervorgang perikardiale Nephrozyten zweiter Teil.</i>	48
<i>Abbildung 16 Fertiges Präparat der perikardialen Nephrozyten.</i>	49
<i>Abbildung 17 Enzymaktivitätstest, Beladung der 96-well Mikroplatte.</i>	55
<i>Abbildung 18 Suche nach Orthologen für GLA mit HGNC Comparison of Orthology Predictions (HCOP)</i>	60
<i>Abbildung 19 NCBI BLAST Suche nach Aminosäuresequenzhomologen für α-Galaktose A in der Fliege</i>	61
<i>Abbildung 20 SWISS-Model Schablone: humane αGLA.</i>	62
<i>Abbildung 21 SWISS-Model Suche für CG5731</i>	62
<i>Abbildung 22 SWISS-Model Suche für CG7997</i>	63
<i>Abbildung 23 Schablonen (grün und gelb) und Modelle (blau und rot) übereinandergelegt.</i>	64
<i>Abbildung 24 Vergleich der aktiven Zentren der beiden humanen Enzyme.</i>	65
<i>Abbildung 25 Vergleich der aktiven Zentren der humanen Enzyme und ihrer Drosophila Homologe</i>	65
<i>Abbildung 26 Flybase – kommerziell erhältliche Fliegenstämme.</i>	66
<i>Abbildung 27 Kreuzungsschema der kombinierten CG5731/CG7997-RNAi Linie.</i>	67
<i>Abbildung 28 Funktionsweise des Enzymaktivitätstests.</i>	69

<i>Abbildung 29 Gemessene durchschnittliche Fluoreszenzaktivität einer Standardkurve von αGAL.</i>	70
<i>Abbildung 30 Ergebnis des Enzymaktivitätstests, Knockoutlinien und Wildtypkontrolle.</i>	71
<i>Abbildung 31 Enzymaktivitätstest der putativen CG5731 Knockoutlinien.</i>	72
<i>Abbildung 32 Ergebnis des Enzymaktivitätstest für die mit Aktin-Gal4 getriebenen RNAi Linien.</i>	73
<i>Abbildung 33 WTB d14, Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	74
<i>Abbildung 34 CG5731 k/o d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	75
<i>Abbildung 35 CG7997 k/o d14, Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	76
<i>Abbildung 36 WTB d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	77
<i>Abbildung 37 CG5731 k/o d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	78
<i>Abbildung 38 CG7997 k/o d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	79
<i>Abbildung 39 Dot-Gal4 \rightarrow WTB d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	80
<i>Abbildung 40 Dot-Gal4 \rightarrow UAS-CG5731-RNAi d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	81
<i>Abbildung 41 Dot-Gal4 \rightarrow UAS-CG7997-RNAi d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	82
<i>Abbildung 42 Dot-Gal4 \rightarrow UAS-CG5731-RNAi, UAS-CG7997-RNAi (DRNAi) d14, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	83
<i>Abbildung 43 Dot-Gal4 \rightarrow WTB d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	84
<i>Abbildung 44 Dot-Gal4 \rightarrow UAS-CG5731-RNAi d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	85
<i>Abbildung 45 Dot-Gal4 x UAS-CG7997-RNAi d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	86
<i>Abbildung 46 Dot-Gal4 \rightarrow UAS-CG5731-RNAi, UAS-CG7997-RNAi d28, TEM Aufnahmen von adulten, perikardialen Nephrozyten.</i>	87

<i>Abbildung 47 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der perikardialen Nephrozyten von 28 Tage alten Fliegen.</i>	88
<i>Abbildung 48 Adulte perikardiale Nephrozyten der CG7997-GFP Linie, d7.</i>	89
<i>Abbildung 49 Schema der endosomalen Kompartimente und ihrer korrespondierenden Marker in der Immunfluoreszenzfärbung von Drosophila Nephrozyten.</i>	90
<i>Abbildung 50 GCN des dritten Larvenstadiums, Immunfluoreszenzfärbung der endosomalen Kompartimente.</i>	90
<i>Abbildung 51 Überlebenskurve ohne Silbernitrat.</i>	91
<i>Abbildung 52 Überlebenskurve mit Silbernitrat.</i>	92
<i>Abbildung 53 Endogener Uptake Versuch der RNAi-Linien.</i>	94
<i>Abbildung 54 Endogener Uptake der Doppel-RNAi Linie im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle.</i>	95
<i>Abbildung 55 Farbentwicklung der Silbernitratablagerungen in WTB Garlandzellen nach 30s Belichtung mit DAPI-Laser (358 nm).</i>	96
<i>Abbildung 56 Silbernitrat Aufnahme in Larve 3 Garlandzellen.</i>	97
<i>Abbildung 57 Schema der Endozytosefunktion eines Drosophila Nephrozyten mit FITC-Albumin.</i>	98
<i>Abbildung 58 Albuminuptake perikardialer Nephrozyten d14.</i>	99
<i>Abbildung 59 Albuminuptake perikardialer Nephrozyten d28.</i>	100
<i>Abbildung 60 Immunfluoreszenzfärbung der endosomalen Kompartimente.</i>	101
<i>Abbildung 61 Immunfluoreszenzfärbung gegen p62 und Atg8a.</i>	103
<i>Abbildung 62 Immunfluoreszenzfärbung gegen p62 und Atg8a, Knockout und Kontrolllinien.</i>	104
<i>Abbildung 63 Schema der Strukturformel von Gb3.</i>	105
<i>Abbildung 64 Immunfluoreszenzfärbung von Globotriaosylceramid.</i>	106
<i>Abbildung 65 Histochemische Färbung von perikardialen Nephrozyten mit Cy5-markierten Lektinen.</i>	107
<i>Abbildung 66 Histochemische Färbung von perikardialen Nephrozyten mit Cy5-markierten Lektinen.</i>	108
<i>Abbildung 67 Histochemische Färbung von perikardialen Nephrozyten mit Cy5-markierten Lektinen.</i>	109
<i>Abbildung 68 Dünnschichtchromatographie d28 Mutanten und Kontrolle.</i>	110
<i>Abbildung 69 Repräsentation der mRNA am Fliegentranskriptom.</i>	111
<i>Abbildung 70 Kreisdiagramm der Genregulation von CG7997 k/o im Vergleich zur Kontrolle.</i>	112

<i>Abbildung 71 Regulierte Stoffwechselwege (GO Terms) von CG7997 k/o im Vergleich zur WTB-Kontrolle.</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 72 Regulation der Enzyme des Stoffwechselweges „Sphingolipidstoffwechsel – Globoserie“.</i>	<i>114</i>

4. Erklärungen zur Promotionsordnung (§ 4 Abs. 1 Nr. 2 - 4)

Ich erkläre, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt, mich außer den angegebenen keiner anderen Hilfsmittel bedient und alle Stellen, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Außerdem erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder annähernd ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt oder noch vorliegen habe. Ich habe zu keinem vorherigen Zeitpunkt eine Doktorprüfung bestanden/nicht bestanden und noch nie ein Promotionsgesuch zurückgenommen.

Freiburg, den 01.02.2017

Alle verwendeten Bilder, auch die von mir modifizierten, die nicht von mir selbst erstellt wurden, sind mit Einverständnis des veröffentlichenden Verlags oder des Urhebers und unter Angabe der Quelle genutzt worden. Hierbei handelt es sich um folgende Abbildungen oder Teile derselben:

- Abbildung 2 Schema des Gal4/UAS-Systems bei Drosophila.
- Abbildung 3 Schema der Funktionsweise der RNA Interferenz in Drosophila in Verbindung mit dem Gal4/UAS-System.
- Abbildung 4 Schematischer Aufbau des renalen Filtrationssystems des Menschen.
- Abbildung 5 Schema des renalen Systems von Drosophila melanogaster.
- Abbildung 6 Exkretorisches System von Säuger (A und A') und Fliege (B und B').
- Abbildung 8 Histologische Veränderungen der Niere bei Fabry Nephropathie.

Freiburg, den 01.02.2017

X. DANKSAGUNG

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein – doch an ihrem guten Gelingen beteiligt waren jede Menge Menschen, denen ich Dank schulde.

Zu Beginn möchte ich meinem Gruppenleiter Prof. Dr. Tobias Huber für die Möglichkeit der Promotion in seiner hochmotivierten Arbeitsgruppe danken. Die Arbeit in seinem Team hat meinen Horizont sehr erweitert.

Großer Dank gilt auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Rüdiger Wanke, der mir bei schwierigen Entscheidungen mit seinem großen Erfahrungsschatz zur Seite stand.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem meinem Betreuer und *Drosophila*experten Dr. Martin Helmstädter, der immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte, und dabei stets optimistisch und aufbauend war.

PD Dr. Oliver Kretz und besonders Barbara Joch danke ich für die TEM-Aufnahmen, und Charlotte Meyer und Dr. Nicola Wanner für die Unterstützung bei der RNA-Isolation und Sequenzierung. Mein Dank gilt außerdem Dr. Robin Teufel für die Unterstützung bei allen biochemischen und bioinformatischen Fragen. Dr. Pavel Stelar danke ich für die kompetente und hilfsbereite Einführung in die Welt der Pipettierroboter und Multiplatereader am Center for Biological Signalling Studies Freiburg (BIOSS).

Zuletzt möchte ich mich bei allen meinen Kollegen, Freunden und Familienmitgliedern bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht hätte – you know who you are.